Eingereicht am 19. 5. 1956.

SYNTHESEN VON AMINOSÄUREN

DURCH HYDRIERENDE AMINIERUNG VON KETOSÄUREESTERN.

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg.

Vorgelegt von

Dipl.-Chem. Hans Joachim Raabe

geboren zu Dorsten.

- Würzburg 1956 -

Eingereicht am 19. 5. 1956.

SYNTHESEN VON AMINOSÄUREN

DURCH HYDRIERENDE AMINIERUNG VON KETOSÄUREESTERN.

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg.

Vorgelegt von

Dipl.-Chem. Hans Joachim Raabe

geboren zu Dorsten.

- Würzburg 1956 -

Tag der mündlichen Prüfung: 23.7. 1956

Berichterstatter: Prof. Dr. F.G. Fischer

Die vorliegende Arbeit wurde von 1953 bis 1956 im Chemischen Institut der Universität Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F.G. Fischer ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer schulde ich besonderen Dank für viele Anregungen, großzügige Förderung sowie fachlichen und persönlichen Rat.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

- Meiner Mutter gewidmet -

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S :

		Seite
A)	E I N L E I T U N G	1
B)	A L L G E M E I N E R T E I L	3
I.	Darstellung von Asparaginsäure aus Oxalessigester	3
1.)	Hydrierende Aminierung von Oxalessigester	3
2.)	Hydrierung von Oxalessigester in Gegenwart verschiedener NH_2-Lieferanten	3
3.)	Übertragung der "Leuckart-Reaktion" auf Oxalessigester	9
II.	Versuche mit Dimethyloxalessigester	10
III.	Hydrierende Aminierung von Acetylbrenztraubensäureäthylester	11
1.)	α-Amino-γ-oxy-n-valeriansäure	11
2.)	α,γ-Diamino-n-valeriansäure	12
IV.	Hydrierende Aminierung von ß-Ketoestern	13
1.)	ß-Aminobuttersäure	13
2.)	2-Aminocyclopentancarbonsäure	15
3.)	ß-Aminoglutarsäure	16
4.)	Papierchromatographisches Verhalten der Aminosäuren	18
V	Reaktionen mit ß-Aminosäuren	19
C)	Z U S A M M E N F A S S U N G	22
D)	E X P E R I M E N T E L L E R T E I L	24
I.	1.) Darstellung des Ausgangsmaterials	24
	2.) Ausführung der Hydrierungen	24
	3.) Hydrierende Aminierung von Oxalessigester	25
	4.a) Oxalessigester + Urotropin	28
	b) Spaltung des Oxalessigester-diphenylhydrazons	29
	c) Versuch der Reduktion von Harnstoff-bis-Oxalessigester	29
	d) Oxalessigester + Hydroxylamin	30
	5.) Übertragung der "Leuckart-Reaktion" auf Oxalessigester	30
II.	Versuche mit Dimethyloxalessigester	31
	a) 2,4-Dinitrophenylhydrazon	31
	b) Dimethyloxalessigester + Ammoniak	32
	c) Dimethyloxalessigester + Hydroxylamin	32

Seite

III. 1) Darstellung von Acetylbrenztraubensäureester 34

a) α-Amino-γ-oxy-n-valeriansäure 34

b) Darstellung von α,γ-Dioximino-n-valeriansäureäthylester 35

c) α,γ-Diamino-n-valeriansäure 36

IV. 1) ß-Aminobuttersäure 37

2) 2-Aminocyclopentancarbonsäure 38

3) ß-Aminoglutarsäure 40

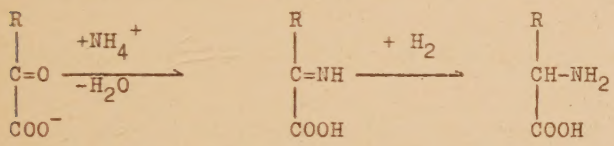
V. 1) N-Carbobenzoxyaminosäuren 41

2) Peptide von ß-Aminosäuren 42

E) L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 45

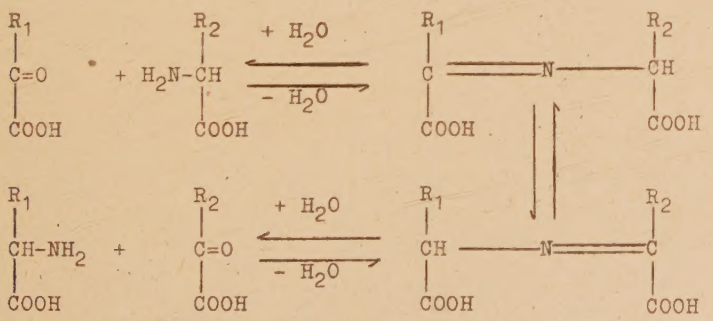
A) EINLEITUNG

Unter den zahlreichen Aminosäuresynthesen ist die KNOOPsche Methode der "hydrierenden Aminierung" von Ketosäuren biochemisch besonders interessant. KNOOP zeigte in seinen bekannten Untersuchungen (1) die Möglichkeit der hydrierenden Aminierung in vitro, indem er Ketosäuren in Gegenwart von Ammoniak an einem Palladium-Katalysator mit einem Wasserstoffdruck von 1 atm bei Raumtemperatur hydrierte:



Bei dieser Synthese sind die Ausbeuten befriedigend bis gut, wenn man ausgehend von α-Ketosäuren α-Aminosäuren darstellt, während ß-Ketosäuren die entsprechenden Aminosäuren in bedeutend geringerer Ausbeute liefern oder sich gar nicht in obigem Sinne umsetzen.

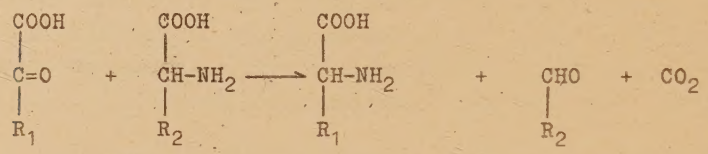
Daß die hydrierende Aminierung auch von der lebenden Zelle zum Aufbau von Aminosäuren ausgenutzt wird, ist von mehreren Autoren bewiesen worden (2), obschon man heute weiß, daß die Aminosäuren auf einem anderen - prinzipiell ähnlichen - Weg durch sogenannte "Transaminierung" aus den entsprechenden Ketosäuren entstehen:



wie insbesondere von A.E. BRAUNSTEIN und M.G. KRITZMANN (3) sowie P.S. CAMMARATA und P.P. COHEN (4) gezeigt wurde. Diese wechselseitige Überführung von Amino- und Ketosäuren inein-

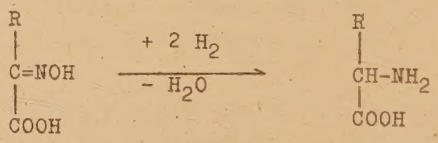
ander vollzieht sich im Organismus unter Mitwirkung von "Transaminasen".

In vitro konnte eine der Transaminierung analoge Reaktion durch R.M. HERBST und L.L. ENGEL (5) realisiert werden.



Für die Synthese von Aminosäuren dürfte diese Reaktion jedoch ohne Bedeutung sein.

Eine weitere Möglichkeit der Aminosäurebildung wies A.I. VIRTANEN (6) für Pflanzen nach, nämlich die Hydrierung der entsprechenden Oximinosäuren:



Die Oximinosäuren entstehen nach VIRTANEN bei der bakteriellen Stickstoffassimilation, indem das zunächst gebildete Hydroxylamin mit den zentralen Ketosäuren des Stoffwechsels reagiert.

Über die rein chemische Reduktion bzw. Hydrierung von Oximinosäuren und deren Estern zu Aminosäuren mit wechselndem Erfolg wird wiederholt berichtet (7). So hydrierten K.E. HAMLIN und W.H. HARTUNG (7) eine Anzahl Oximinosäuren bzw. -ester mit Palladium-Kohle in Ausbeuten von 70-90% zu Aminosäuren, während J.C. SHIVERS und C.R. HAUSER (7) bei der Hydrierung einiger Oximinoester am Raney-Kontakt Ausbeuten von 50-90% berichten. W. COCKER gelang es dagegen nicht, Oximinobernsteinsäureester katalytisch zum Asparaginsäureester zu hydrieren.

Für die vorliegende Arbeit ergab sich die Aufgabe, zu untersuchen, ob auch eine hydrierende Aminierung von Ketoestern, wo bislang nur negative Ergebnisse berichtet worden waren (8), möglich ist. Ferner war zu prüfen, ob auch andere NH_2-Gruppen liefernde Komponenten zur Überführung der Ketosäureester in Aminosäureester geeignet sind.

Besondere Aufmerksamkeit war dabei den zunehmend an physiologischer Bedeutung gewinnenden ß-Aminosäuren zu widmen, über deren Reaktionen nur wenig bekannt ist.

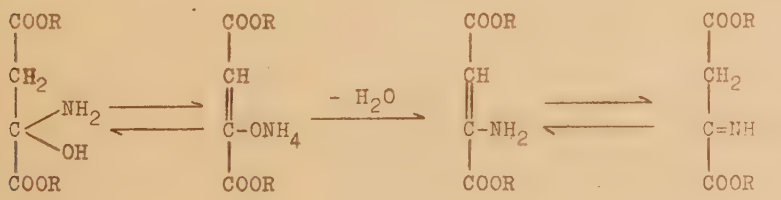
B) A L L G E M E I N E R T E I L.

I. Hydrierende Aminierung von Oxalessigester.

Da Oxalessigsäure und die aus ihr entstehende Asparaginsäure im pflanzlichen und tierischen Stoffwechsel eine zentrale Stellung einnehmen, war es naheliegend, am Beispiel des Oxalessigesters auch die hydrierende Aminierung von Ketoestern zu versuchen.

KNOOP erhielt bereits die Asparaginsäure in 26%iger Ausbeute, als er Oxalessigsäure in wäßrig-alkoholischer Lösung bei Ammoniaküberschuß mit einem Wasserstoffdruck von 1 atm bei Raumtemperatur am Palladium-Kontakt hydrierte (1). Indessen blieben seine Versuche, aus Oxalessigester mit Ammoniak durch katalytische Hydrierung Asparaginsäure zu erhalten, ohne Erfolg.

Bei den eigenen Versuchen wurde zunächst die Einwirkung von Ammoniak auf Oxalessigester näher studiert. Läßt man Oxalessigester unter Kühlung zu einer äthanolischen Ammoniaklösung tropfen, so scheidet sich sofort ein farbloser käsiger Niederschlag ab. Dieser sogenannte "Ammoniak-Oxalessigester" ist die in freiem Zustand nicht lange haltbare Additionsverbindung von Ammoniak an Oxalessigester (I). Nach einigen Tagen geht er durch intermolekulare Kondensation in eine zerfließliche zähe Masse über.



a b

I II

Ammoniak-Oxalessigester Aminofumarester Iminobernsteinsäureester

Ob die Additionsverbindung eine Struktur analog den Aldehydammoniakaten (a) besitzt, oder als Ammoniumsalz des Esterenolats (b) vorliegt, hängt vom jeweiligen Lösungsmittel ab.

Intramolekulare Wasserabspaltung zum Aminofumarester tritt erst bei höherer Temperatur ein. Hierin dürfte auch der Grund für die negativen Ergebnisse KNOOPs zu suchen sein, der ja bei Raumtemperatur arbeitete. KNOOP und OESTERLIN untersuchten in ihrer Arbeit, ob die Oxyaminoverbindung hydriert wird, oder der Wasserstoff erst nach vorhergehender Wasserabspaltung an die Iminoverbindung angelagert wird auf folgende Weise: Statt in Gegenwart von Ammoniak hydrierten sie in Gegenwart von primären und sekundären Aminen, wobei sich zeigte, daß mit primären Aminen N-alkylierte Aminosäuren entstehen. Dagegen wurden mit sekundären Aminen, wo die Oxyaminoverbindung noch entstehen kann, die Bildung der Iminoverbindung jedoch nicht mehr möglich ist, keine Aminosäuren mehr erhalten. Daraus folgt, daß unter den von KNOOP gewählten Bedingungen die Hydrierung erst bei der Iminoverbindung bzw. dem Amin der ungesättigten Säure einsetzt, während die Oxyaminoverbindung nicht angegriffen wird. Dadurch wären die negativen Ergebnisse bei der Hydrierung des Ammoniak-Oxalessigesters - einer Oxyaminoverbindung - erklärt.

Bei der Vakuumdestillation des Adduktes tritt neben der intramolekularen Wasserabspaltung in geringem Umfang Verseifung und Decarboxylierung ein. Hauptreaktion ist jedoch die Kondensation zum Ammoniumsalz des Oxalcitronensäurelactonesters (III), das als zähes Harz im Destillationskolben zurückbleibt, wie schon W. WISLICENUS und W. BECKH (9) beschreiben.

III

Oxalcitronensäure-lactonester

Das Destillat besteht zum größten Teil aus Aminofumarester, der in 20-25%iger Ausbeute entsteht. Dieser Ester konnte nun mit einer Ausbeute von 75% zum Asparaginsäureester hydriert werden.

Man braucht aber, um zum Asparaginsäureester zu gelangen, den Aminofumarester gar nicht erst zu isolieren, sondern kann einfacher den Ammoniak-Oxalessigester direkt hydrieren, indem

man die Wasserabspaltung während der Hydrierung im Autoklaven vornimmt. Wegen der Schwerlöslichkeit der Verbindung in Äthanol wurde zu Beginn der Hydrierung eine oberhalb des Schmelzpunktes liegende Temperatur gewählt, bei der die Verbindung in Lösung geht Dabei erfolgt offenbar als Hauptreaktion ebenfalls eine intermolekulare Kondensation, die zur Verbesserung der Ausbeute möglichst hintanzuhalten ist

Um dies zu erreichen, wurden die Versuchsbedingungen in folgender Weise variiert:

1.) Da Ammoniak-Oxalessigester sich schon bei Raumtemperatur in Dioxan gut löst, wurde dieses Lösungsmittel zur Vermeidung der hohen Anfangstemperatur verwandt. Doch änderte sich auch bei Arbeiten in hoher Verdünnung - zur Einschränkung intermolekularer Kondensation - die Ausbeute ebensowenig wie bei Ausführung der Hydrierung in Äther und Methanol

2.) Zusammengeben der Komponenten unter Kühlung und Hydrierung bei tiefer Temperatur brachte das gleiche Ergebnis wie Zusammengeben ohne Kühlung, kurzem Erwärmen auf 90° und anschließender Hydrierung

3.) Auch Einpressen von Ammoniak erst bei 80° zu dem bereits im Autoklaven befindlichen Oxalessigester und sofort anschließende Hydrierung brachte keine Verbesserung der Ausbeute.

4.) Als das freie Ammoniak durch Ammoniumacetat ersetzt wurde - in der Hoffnung durch den niedrigeren p_H-Wert die Tendenz zur Kondensation zurückzudrängen - ergab sich keine Verbesserung sondern eine Verschlechterung der Ausbeute. Ebensowenig führte die gleichzeitige Zugabe von Ammoniak und Ammonacetat zu besseren Ergebnissen.

5.) Zusätze von Schwermetallionen sollen die Aktivität des Raney-Katalysators erhöhen, doch konnte bei den unternommenen Versuchen mit Nickelsulfatzusatz in wässriger Lösung keine schnellere Wasserstoffaufnahme oder eine Verbesserung der Ausbeute erzielt werden.

Bei allen Hydrierungen ist darauf zu achten, die Hydrierungsdauer bei 80° und nicht höher so klein wie möglich zu halten und die Vakuumdestillation so rasch wie möglich durchzuführen, da sonst infolge von Diketopiperazinbildung die Ausbeute an Aminosäureester sinkt.

Hydriert man in wässriger oder wässrig-alkoholischer Lösung, so tritt teilweise eine Verseifung des Aminosäureesters ein, die man dann am zweckmäßigsten durch Kochen mit Barytlauge zu Ende führt. Die Isolierung der Asparaginsäure nach Fällen der Bariumionen ist jedoch mühevoll und zeitraubend infolge der mitentstandenen Verharzungsprodukte. Relativ am einfachsten ist wohl noch die Veresterung der Aminosäure und Abtrennung durch Destillation. Besser aber vermeidet man diese Schwierigkeiten, indem man von vornherein in wasserfreiem Medium arbeitet, wo sich Isolierung und Aufarbeitung ungleich einfacher gestalten.

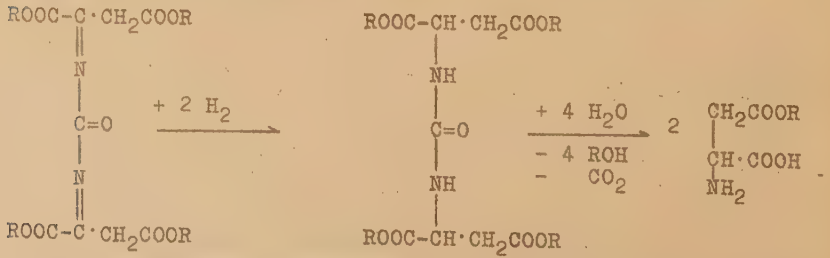
2. Hydrierung von Oxalessigester in Gegenwart verschiedener NH_2-Lieferanten.

a) Oxalessigester + Urotropin.

Es wurde auch die Hydrierung von Oxalessigester in Gegenwart von Urotropin als NH_3-Spender in äthanolischer Lösung untersucht. Zwar wurden bei der Hydrierung beträchtliche Mengen Wasserstoff aufgenommen, bedingt durch die Bildung von Ammoniak, Methan, Methanol und Trimethylamin aus Urotropin, doch konnte nach der Entfernung des Lösungsmittels in keinem Fall ein destillierbares Produkt erhalten werden. Nach Hydrolyse des Reaktionsgemisches ließen sich papierchromatographisch Spuren von Asparaginsäure nachweisen.

b) Hydrierungs- und Reduktionsversuche am Harnstoff-bis-oxalessigester.

Aus Harnstoff und Oxalessigester entsteht das Bis-Oxalessigester-Derivat des Harnstoffs (IV), dessen katalytische Hydrierung zunächst zum Harnstoffderivat (V) führen müßte, welches bei Verseifung dann 2 Mol Asparaginsäure liefern sollte:

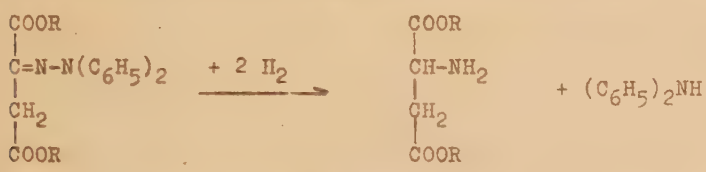


Die katalytische Hydrierung gelang jedoch unter den angewandten Bedingungen (150 atm. 80-100°) nicht, vielmehr zer-

setzte sich die Verbindung. Reduktion mit Natrium in Alkohol blieb ebenfalls erfolglos, dagegen konnten mit Aluminiumamalgam in feuchtem Äther nach Verseifung geringe Mengen Asparaginsäure papierchromatographisch nachgewiesen werden.

c) Oxalessigester + as. Diphenylhydrazin.

Ebenfalls zum Asparaginsäureester führen sollte die katalytische Hydrierung des Oxalessigester-diphenylhydrazons, wobei die N-N-Bindung hydrierend gespalten werden müßte.



Die Komponenten wurden in Äthanol kurze Zeit erwärmt und nach mehrstündigem Stehen wie üblich hydriert. Neben Asparaginsäureester, der in 20%iger Ausbeute entstand, ging auch noch etwas Äpfelsäureester bei der Vakuumdestillation über, während beträchtliche Mengen harzartiger Rückstände zurückblieben. Zur Trennung vom Äpfelsäureester wurde der Asparaginsäureester in Aceton als Oxalat gefällt. Dieses läßt sich mit Barytlauge leicht zur Asparaginsäure verseifen.

d) Oxalessigester + Hydroxylamin

Nachdem schon zuvor A. PIUTTI (7) sowie W. DIECKMANN (7) durch Reduktion von Oximinoestern und -säuren mit Natriumamalgam bzw. Zinn und Salzsäure zu den entsprechenden Aminosäuren gelangt waren, erhielten C. REDEMANN und S. DUNN (7) im Jahre 1939 verschiedene Aminosäuren, darunter auch Asparaginsäure durch katalytische Hydrierung von Oximinomalonester und anschließende Malonestersynthese. Im gleichen Jahre und in den darauf folgenden erschien eine Reihe von Arbeiten über die katalytische Hydrierung von Oximinoverbindungen (7). Als Katalysatoren diente meist Palladium-Kohle, Platin und Platinoxyd. Diese werden dem Raney-Katalysator bisweilen vorgezogen, da sie eine Hydrierung im sauren Medium erlauben. Umwandlungen von Oximino- und Iminogruppen in die Aminogruppen verlaufen nämlich im sauren durchweg glatter, als im neutralen oder alkalischen Bereich, da hier häufig als Nebenprodukte noch die sekundären Amine entstehen.

Die katalytische Hydrierung von Oximinobernsteinsäureester versuchte zuerst W. COCKER (7), dem es jedoch nicht gelang, mit

verschiedenen Katalysatoren in Methanol Asparaginsäureester zu erhalten. Er benutzte dann erfolgreich Aluminiumamalgam in Äther zur Reduktion.

Demgegenüber gelang es bei den unternommenen eigenen Versuchen nach anfänglichen Mißerfolgen aus Oximinobernsteinsäureester mit Raney-Nickel als Katalysator in verschiedenen Lösungsmitteln Asparaginsäureester in guter Ausbeute zu erhalten.

Die Ausführung gestaltet sich am einfachsten, wenn man den Oximinobernsteinsäureester aus dem Natriumenolat des Oxalessigesters und Hydroxylaminchlorhydrat durch Schütteln in wässriger Lösung darstellt und durch Ausäthern abtrennt. Da Oximinobernsteinsäure-diäthylester nicht kristallisiert und auch nicht durch Vakuumdestillation gereinigt werden kann, hydrierten wir die mit Natriumsulfat getrocknete Ätherlösung direkt, wobei der Asparaginsäureester in einer Ausbeute von 54% erhalten wurde. Schon durch Kochen mit Wasser am Rückfluß bildet sich daraus nach kurzer Zeit Asparaginsäure, die isoliert und durch Bestimmung der physikalischen Konstanten sowie durch papierchromatographische Vergleiche einwandfrei identifiziert wurde. Als günstigste Reaktionstemperatur erwies sich der Bereich von 70-80°. Während bei tieferen Temperaturen die Hydrierungsgeschwindigkeit zu langsam ist, finden bei höheren Temperaturen intermolekulare Kondensationen statt sowie eine erhöhte Diketopiperazinbildung. Man erhält dann nach der Vakuumdestillation in großer Menge harzartige Rückstände. Änderungen des Wasserstoffdruckes von 20-100 atm beeinflussen die Hydrierungsgeschwindigkeit nicht wesentlich, ebensowenig ändert sich die Ausbeute des Hauptproduktes.

Als Lösungsmittel wurde bei der Hydrierung des Oximinobernsteinsäureesters Äther bevorzugt, da man den aus Na-Oxalessigester und Hydroxylaminchlorhydrat erhaltenen Oximinoester ohnedies aus der wässrigen Lösung ausäthern muß. Mit anderen Lösungsmitteln entstand ebenfalls in etwa gleicher Ausbeute Asparaginsäureester. Außer Äther wurden noch Methanol, Äthanol und Essigester benutzt.

Die Ausbeuten in den verschiedenen Lösungsmitteln sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Oximino-ester	Lösungs-mittel	Bedingungen	Ausbeute an Aminoester
13 g	Äther	50 atm, 70° 3,5 h	6 g = 49%
26 g	Äther	47 atm, 70° 3 h	13g = 54%
26 g	Essigester	40 atm, 70-80° 6 h	10g = 41%
13 g	Methanol	45 atm, 70° 3 h	6 g = 49%
13 g	Äthanol	45 atm, 70° 3 h	5,5g = 45%

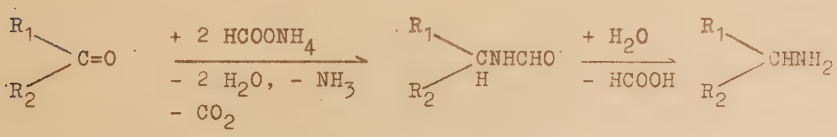
Tab.1 Hydrierung von Oximinobernsteinsäureester in verschiedenen Lösungsmitteln.

Die Wasserstoffaufnahme war meist 2-3 Stunden nach Erreichen der Reaktionstemperatur beendet und betrug in allen Lösungsmitteln 80-100%. Ein geringer Teil des Reaktionsproduktes ist wahrscheinlich als Diketopiperazin im Reaktionsgemisch enthalten, dessen Bildung schon nach längerem Stehen des Aminosäureesters bei Raumtemperatur eintritt. Es scheiden sich farblose, glänzende Blättchen ab. Der Schmelzpunkt der zweimal aus Wasser umkristallisierten analysenreinen Verbindung wurde mit 195-196° bedeutend höher gefunden, als der von E. FISCHER und E. KOENIGS (10) mit 179-180° angegebene.

Eine Hydrierung mit Raney-Kobalt, das höhere Ausbeuten an primären Aminen geben soll als Raney-Nickel, wurde ebenfalls versucht. Jedoch fand bei vollkommen analoger Ausführung der Reaktion stets eine vollständige Verharzung des Oximinoesters im Autoklaven statt.

3.) Übertragung der "Leuckart-Reaktion" auf Oxalessigester.

Zur Darstellung von Aminen wird bisweilen die als "Leuckart-Reaktion" bezeichnete Umsetzung von Aldehyden und Ketonen mit Formamid bzw. Ammoniumformiat bei 150-180° benutzt (11):



Häufig wird dem Reaktionsansatz noch Ameisensäure zugesetzt. Man erhält das entsprechende formylierte Amin, aus dem durch Hydrolyse das freie Amin entsteht. Mit Ketosäuren oder deren Estern sollte man so Aminosäuren erhalten.

Bei den Versuchen, auf diesem Wege zur Asparaginsäure zu gelangen, wurde zunächst nach der von A.N. KOST für Ketone angegebenen Methode (12) Oxalessigester mit drei Äquivalenten Formamid unter Zusatz von etwas Raney-Nickel mehrere Tage auf 100-150° erwärmt. Asparaginsäure konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch Zugabe von Benzoylperoxyd - KOST nimmt radikalischen Mechanismus an - änderte das Ergebnis nicht.

Dagegen konnte nach Zusatz von 90%iger Ameisensäure die Bildung geringer Mengen Asparaginsäure papierchromatographisch nachgewiesen werden. Interessanterweise bildet sich bei dieser Reaktion Alanin mit 3%iger Ausbeute, wie wir ebenfalls im Papierchromatogramm feststellten. Die Bildung des Alanins ist eine Folge der teilweisen Hydrolyse und Decarboxylierung des Oxalessigesters zur Brenztraubensäure, die sich dann mit Formamid im Sinne der Leuckart-Reaktion zu Alanin umsetzt.

II.) Versuche mit Dimethyloxalessigester.

Zum Vergleich mit Oxalessigester wurde Dimethyloxalessigester $ROOC \cdot C(CH_3)_2 \cdot CO \cdot COOR$ herangezogen und zu seiner eindeutigen Identifizierung noch das nicht beschriebene 2,4-Dinitrophenylhydrazon dargestellt.

Durch die Methylgruppen ist hier die reaktionsfähige CH_2-Gruppe im Molekül des Oxalessigesters besetzt, die für dessen intermolekulare Kondensation verantwortlich zu machen ist. Ebenso ist die Enolisation der Carbonylgruppe ausgeschlossen, so daß man die Reaktionen der reinen Ketoform studieren kann.

Zunächst wurde die Hydrierung der Verbindung bei Gegenwart von Ammoniak in absolutem Alkohol versucht. Hierbei findet keine Wasserstoffaufnahme statt, vielmehr gibt die Verbindung in solchen Lösungen schon bei Raumtemperatur nach kurzer Zeit einen farblosen Niederschlag. Dieser ist jedoch nicht die dem Ammoniak-Oxalessigester analoge Additionsverbindung sondern Oxalsäurediamid. Bei der Einwirkung von Ammoniak findet also sehr leicht Säurespaltung statt, wodurch sich das negative Ergebnis der Hydrierung erklärt.

Erhitzt man dagegen Dimethyloxalessigester mit überschüssigem Hydroxylamin in alkoholischer Lösung und hydriert anschlies-

send, so erhält man den Aminosäureester in etwa 60%iger Ausbeute. Er wurde wiederum als Oxalat aus Acetonlösung gefällt.

Bei der Verseifung des Oxalats erhält man eine Aminosäure, die zunächst für Dimethylasparaginsäure gehalten wurde. Die Analyse des α-Naphthylisocyanat-Adduktes ergab jedoch, daß es sich nicht um diese, sondern um eine durch Decarboxylierung aus ihr entstandene Aminosäure handelt. Der papierchromatographische Vergleich mit Valin ergab Übereinstimmung der R_f-Werte. Die Carboxylgruppe am quartären C-Atom ist offenbar sehr unbeständig und wird bei der Verseifung abgespalten. Auch bei schonender Hydrolyse des Aminosäureester-oxalates - Barytlauge bei Raumtemperatur - tritt schon Decarboxylierung ein, doch nur teilweise.

$$ROOC\text{-}C(CH_3)_2CO\text{-}COOR' + NH_2OH \xrightarrow[-\ H_2O]{+\ 2\ H_2} ROOC\text{-}C(CH_3)_2CH(NH_2)\text{-}COOR$$

$$\xrightarrow{+\ 2\ H_2O} CH(CH_3)_2CH(NH_2)\text{-}COOH + CO_2 + ?\ ROH$$

Denn es läßt sich papierchromatographisch eine Aminosäure von annähernd gleichem R_f-Wert wie Asparaginsäure nachweisen, die mit der Dimethylasparaginsäure identisch sein dürfte. Damit eröffnet sich ein Weg, diese interessante Säure darzustellen.

III.) Hydrierende Aminierung von Acetylbrenztraubensäureäthylester.

α-Amino-γ-oxy-n-valeriansäure.

Die hydrierende Aminierung der freien Acetylbrenztraubensäure nach KNOOP dürfte nicht möglich sein, da die Säure mit wässrigem Ammoniak Säurespaltung erleidet (14). Daher erschien der Versuch, die Synthese vom beständigeren Ester aus durchzuführen, besonders reizvoll. Zudem hat man die Möglichkeit, den Ester nur einmal zu aminieren, da man bei Einwirkung von Ammoniak den α-Imino-γ-ketoester erhält, zum anderen jedoch beide Ketogruppen in Aminogruppen zu überführen, wenn es gelänge, das bislang unbekannte Dioxim darzustellen.

Wenn man in die ätherische Lösung des Acetylbrenztraubensäureäthylesters Ammoniak einleitet, erhält man zunächst sein Ammoniak-Addukt, woraus durch Erhitzen auf 80-100° die α-Iminoverbindung entsteht ($CH_3CO\ CH_2C(=NH)\ COOR$). Diese Verbindung läßt sich in der üblichen Weise zum Aminoester hydrieren, einer aminartig riechenden, basischen Verbindung. Reinigung des Esters durch Vakuumdestillation ist nicht möglich, weil vollständige

Verharzung eintritt. Zur Umwandlung in die Säure verseift man den Ester zweckmäßig durch Erhitzen in wässrig-alkoholischer Lösung. Nach Abdampfen des Lösungsmittels kristallisierte die Säure aber noch nicht aus. Sie wurde daher am Ionenaustauscher von den Verunreinigungen befreit und schmolz nach Umkristallisation aus Äthanol-Wasser bei 205° unter Zersetzung. Die Stickstoffbestimmung ergab den für α-Amino-γ-oxy-n-valeriansäure geforderten Wert.

Hydriert man bei etwas höherer Temperatur (100-110°), so kristallisiert nach Entfernen des Lösungsmittels ein Teil des Rückstandes aus. Die neutral reagierende Substanz gibt keine Ninhydrinreaktion. Die naheliegende Vermutung, daß es sich um das Diketopiperazin des α-Amino-γ-oxy-n-valeriansäure-äthylesters handelt, konnte durch Stickstoffbestimmung, sowie Vergleich der physikalischen Konstanten bestätigt werden. Die Verbindung besitzt nach Umkristallisieren aus Äthanol einen Schmelzpunkt von 213-215°.

α,γ-Diamino-n-valeriansäure.

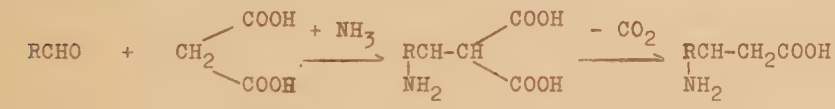
Für die Darstellung der bisher nicht bekannten Aminosäure schien der Weg über das Dioxim am ehesten aussichtsreich. Diese ebenfalls noch nicht beschriebene Verbindung wurde durch Reaktion des Diketoesters mit Hydroxylaminchlorhydrat bei Gegenwart von Pyridin in Äthanol erhalten. Literaturangaben (14) berichten nur über die Bildung von Isoxazolderivaten aus Acetylbrenztraubensäureester und Hydroxylamin. Die unterschiedlichen Ergebnisse dürften durch die verschiedenen Lösungsmittel bedingt sein. L. CLAISEN führte die Umsetzung in Eisessig aus, wodurch der Ringschluß begünstigt wird.

Der Dioximinoester konnte in farblosen Kristallen vom Schmelzpunkt 129° erhalten werden. Er löst sich gut in Äther und wurde aus Essigester umkristallisiert. Die Verbindung wurde unter den üblichen Bedingungen hydriert und das aminartig riechende Hydrierungsprodukt mit HCl verseift. Nach Umwandlung des Hydrochlorids in die freie Säure erhielten wir zunächst einen zähen Sirup, der nach wiederholtem Anreiben mit Äther und Evakuieren fest wurde. Die Substanz ist stark hygroskopisch und gibt die Ninhydrinreaktion. Mit Pikrolonsäure gibt sie in wässriger Lösung ein gelbes Pikrolonat vom Schmelzpunkt 190° (Zers.). Im Papierchromatogramm zeigte sich, daß die Säure noch durch geringe Mengen α-Amino-γ-oxy-n-valeriansäure verunreinigt ist.

IV.) Über die hydrierende Aminierung von ß-Ketoestern.

Während es für α-Aminosäuren zahlreiche Synthesen gibt, sind die Methoden zur Darstellung von ß-Aminosäuren noch begrenzt Dabei beanspruchen ß-Aminosäuren in steigendem Maße unser Interesse. Erinnert sei nur an Penicillin, ein ß-Lactam, sowie an das Vorkommen des ß-Alanins in der Pantothensäure und somit im Coenzym A Hinzu kommen Beobachtungen in jüngster Zeit über das Vorkommen der ß.ε-Diaminocapronsäure in verschiedenen Antibiotika (15), sowie über das Vorkommen von ß-Aminosäuren in Pflanzen (6). In neuester Zeit finden sich daher auch mehrere Arbeiten über ß-Aminosäuren in der Literatur (16).

Allgemeinere Bedeutung haben für die Synthese von ß-Aminosäuren die Anlagerung von Ammoniak an α,ß-ungesättigte Carbonsäuren, die V.M. RODIONOV (17) dahingehend modifizierte, daß er die ungesättigte Säure erst während der Reaktion aus einem Aldehyd und Malonsäure herstellte:

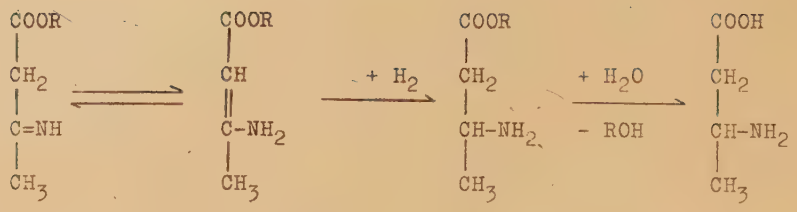


sowie die von verschiedenen Autoren beschriebene Reduktion der Acetylhydrazone von ß-Ketosäuren, auf die wir im folgenden noch zurückkommen

Die hydrierende Aminierung von ß-Ketosäureestern schien zur Synthese von ß-Aminosäuren deshalb besonders gut geeignet, weil eine Anzahl von ß-Ketoestern beständige ß-Iminocarbonsäureester bilden, deren Hydrierung zur Aminoverbindung möglich sein sollte Diese Erwartung konnte an den untersuchten Beispielen auch vollauf bestätigt werden.

1.) ß-Aminobuttersäure.

Wenn man zu Acetessigester eine alkoholische Ammoniaklösung tropfen läßt, so scheidet sich keine Additionsverbindung aus, wie man sie beim Oxalessigester beobachten kann Die Additionsverbindung ist in diesem Fall so unbeständig, daß sie unter Wasserabspaltung sofort in den Iminobuttersäureester (VI) bzw. dessen tautomere Form, den ß-Aminocrotonsäureester (VII) übergeht.



VI VII

Die Hydrierung mit Raney-Nickel gelang leicht bei 70-80° mit 60%iger Ausbeute. KNOOP hatte hier keinen ß-Aminosäureester erhalten können (8), während A. SKITA und C. WULFF berichten, daß ß-Aminocrotonsäureester "wohl nicht selbst aber als Acetylderivat hydriert werden kann" (8). Nach Beendigung der eigenen Versuche, die in äthanolischer Lösung ausgeführt wurden, fanden wir in der Literatur eine kurze Mitteilung (Patent vom Jahre 1930) über die katalytische Hydrierung von ß-Aminocrotonsäureester in wässriger Lösung mit Raney-Nickel als Katalysator (18) unter Zusatz von $NiSO_4$. Die Ausbeute wird nicht angegeben.

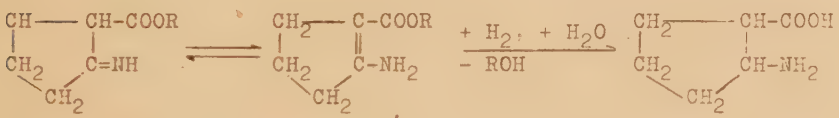
Da ß-Aminocrotonsäureester sich direkt beim Einleiten von Ammoniak in Acetessigester bildet, kann man diese Lösung nach Abtrennung des gebildeten Wassers sofort hydrieren. Auch hier verlief die Reaktion glatt mit gleicher Ausbeute wie oben. Um zur Aminosäure zu gelangen, kann man entweder den Aminoester zunächst als Oxalat fällen und dann die Verseifung mit Barytlauge vornehmen oder man verseift in wässrig-alkoholischer Lösung. Die letzte Methode ist bedeutend einfacher und gibt auch etwas bessere Ausbeuten; deshalb ist sie vorzuziehen, wenn der Aminosäureester keine oder nur geringe Verunreinigungen an Oxyester enthält. Besonders rein ist der Aminosäureester, wenn man den ß-Aminocrotonsäureester vor der Hydrierung durch Destillation isoliert. Die ß-Aminobuttersäure kristallisiert beim Einengen der wässrigen Lösung im Vakuum in sehr reiner Form aus und besitzt den in der Literatur angegebenen Schmelzpunkt (184°).

Als Nebenprodukt entstehen bei der Hydrierung des ß-Aminocrotonsäureesters zum Teil beträchtliche Mengen einer höhersiedenden Fraktion, die bei 170°/14 mm überging. Es handelt sich um das bisher nicht beschriebene (Di-ß-buttersäureäthylester)-amin $(ROOC \cdot CH_2 \cdot CH(CH_3))_2 NH$. Die Analyse stimmt mit der

vermuteten Formel überein Ferner reagiert die Verbindung basisch und gibt ein Hydrochlorid, während die Isonitril-reaktion negativ ausfällt.

2.) 2-Aminocyclopentancarbonsäure (X)

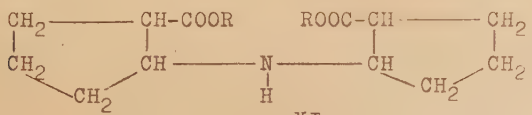
Aus Cyclopentanoncarbonsäure-äthylester bildet sich wie aus Oxalessigester zunächst die Ammoniak-Additionsverbindung, wenn man äthanolische Ammoniaklösung in der Kälte zutropft Sie kristallisiert nach kurzer Zeit aus, wodurch die gesamte Lösung zu einem Brei erstarrt Bei Raumtemperatur geht nach wiederholtem Schütteln im Laufe eines Tages wieder alles in Lösung, und nach etwa zwei Tagen ist die Bildung des 2-Iminocyclopentan- carbonsäureesters (VIII) beendet. Auch hier besteht wieder die Möglichkeit einer Ketimid-Enamin-Tautomerie.



VIII IX X

Um bei der Hydrierung, die unter den üblichen Bedingungen erfolgt, gute Ausbeuten zu erzielen, ist es erforderlich, Raney-Nickel hoher Aktivität zu benutzen. Sämtliche Hydrierungen der obigen Verbindung wurden daher mit ganz frisch bereitetem Katalysator ausgeführt So konnte diese bisher noch nicht beschriebene Verbindung in 85% der theoretischen Ausbeute dargestellt werden. Es handelt sich um eine farblose Flüssigkeit von aminartigem Geruch, die bei 100-102°/12 mm siedet. Sie ist hygroskopisch und mit organischen Lösungsmitteln mischbar. Das in Aceton schwerlösliche Oxalat schmilzt analysenrein bei 192°

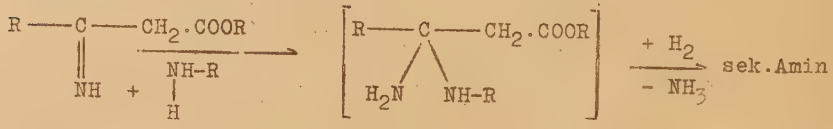
Auch hier entsteht bei der Hydrierung noch ein zweites höhersiedendes Produkt, das durch Analyse und Reaktionen als (Di-2-cyclopentancarbonsäure-äthylester)-amin erkannt wurde (XI).



XI

Die Verbindung siedet bei 140-142°/0,05 mm, reagiert basisch und gibt keine Isonitrilreaktion.

Die Bildung dieser sekundären Amine dürfte so zustandekommen, daß bei der Hydrierung ein zum Aminosäureester hydriertes Molekül sich an ein Molekül noch unangegriffener Iminoverbindung addiert, worauf durch Ammoniak-Abspaltung das sekundäre Amin entsteht:



Durch Verseifung des Aminocarbonsäureesters durch Kochen in wässrig-alkoholischer Lösung erhält man die bisher noch nicht bekannte 2-Aminocyclopentancarbonsäure (X) in 95%iger Ausbeute. Die Verseifung der Aminosäureester in wässrig-alkoholischer Lösung bietet infolge der leichten Verseifbarkeit dieser Verbindungen große Vorteile gegenüber saurer oder alkalischer Hydrolyse, wo die Aufarbeitung nicht nur mühevoll sondern auch mit beträchtlichen Material- und Zeitverlusten verbunden ist. Bereits beim Abkühlen der Lösung kristallisiert ein Teil der Verbindung analysenrein aus. Die so erhaltene Aminosäure enthält ein Mol Kristallwasser, das erst bei längerem Erhitzen im Vakuum abgegeben wird. Der Schmelzpunkt der analysenreinen Substanz beträgt 242° (Zers.). Die Säure löst sich gut in Wasser; in Alkohol ist sie nur wenig, in anderen organischen Lösungen unlöslich

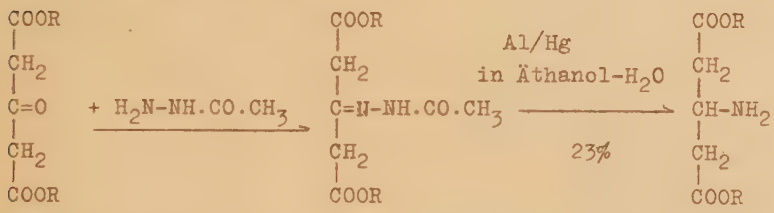
Wie die anderen ß-Aminosäuren so gibt auch 2-Aminocyclopentancarbonsäure eine positive Ninhydrinreaktion, wenn auch bedeutend langsamer als die α-Aminosäuren. Am besten gelingt die Reaktion, wenn man sie in einer Mischung von Diäthylenglykol und Wasser in möglichst neutraler Lösung ausführt. Beim Erhitzen auf dem Wasserbad tritt nach etwa 15 Minuten die charakteristische Violettfärbung ein.

3.) ß-Aminoglutarsäure.

Über Versuche zur Darstellung von ß-Aminoglutarsäure finden sich in der Literatur einige Angaben. So berichtet W.O. EMERY (19) über einen allerdings erfolglosen Versuch der Reduktion von ß-Oximinoglutarester. Jüngst beschrieben J.GOOTJES und W.Th. NAUTA (8) Versuche der reduktiven und hydrierenden Aminierung von Acetondicarbonsäure-diäthylester, die ebenfalls ohne Erfolg blieben. Außer katalytisch mit Raney-Nickel

versuchten sie auch mit amalgamiertem Aluminium zum Ziel zu kommen. Sonst fehlen nähere Angaben über die Versuchsbedingungen.

GOOTJES und NAUTA konnten dann die ß-Aminoglutarsäure durch Reduktion des Acetondicarbonsäureester-acetylhydrazons auf folgendem Weg erhalten:



Der ß-Aminoglutarester wurde von ihnen als Oxalat abgetrennt und dieses mit Barytlauge in 50%iger Ausbeute zur ß-Aminoglutarsäure verseift. Die Ausbeute an Aminosäure bezogen auf den Acetondicarbonsäureester beträgt also etwa 10%, wenn man für die Bildung des Acetylhydrazons die theoretische Ausbeute annimmt. Die geringe Ausbeute bei der Reduktion ist sicher durch das Arbeiten im wässrigen Milieu mitbedingt, wodurch ein Teil des Esters verseift wird und sich so der Fällung mit Oxalsäure entzieht.

Für die eigenen Versuche war es naheliegend, die Hydrierung des beständigen Imins des Acetondicarbonsäureesters zu versuchen. Die Wasserstoffaufnahme erfolgte glatt bei 80°. Der noch nicht bekannte ß-Aminoglutarester konnte in einer Ausbeute von 85% erhalten werden, seine Verseifung zur ß-Aminoglutarsäure verläuft praktisch quantitativ (94% d.Th.). Die so erhaltene ß-Aminoglutarsäure schmilzt nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser bei 275-277° unter Zersetzung; GOOTJES und NAUTA geben 276-280° an.

Die Methode der hydrierenden Aminierung ist also einmal wegen der bedeutend einfacheren Ausführung, zum anderen wegen der achtmal so hohen Ausbeute der Reduktion des Acetylhydrazons vorzuziehen und stellt eine gute Synthese für diese interessante Säure dar.

Die Bildung nennenswerter Mengen Diamin wurde hier nicht beobachtet. Es wurde auch versucht, die ß-Aminoglutarsäure durch hydrierende Aminierung der freien Säure zu erhalten.

Als die freie Säure mit wechselnden Mengen Ammoniak (2-6 Mol)

in der Kälte versetzt wurde, erfolgte sowohl in wässriger als auch in alkoholischer Lösung schon teilweise Decarboxylierung. Bei der Hydrierung wurde zwar Wasserstoff aufgenommen, jedoch konnte, nachdem das Hydrierungsprodukt mittels Ionenaustauscher in die freie Säure verwandelt worden war, kein kristallisiertes Produkt erhalten werden. Die Säure enthielt auch keinen Stickstoff mehr. Daher dürfte es sich wohl um ein Gemisch der ß-Oxyglutarsäure und der durch Decarboxylierung aus ihr entstandenen ß-Oxybuttersäure handeln, denn die Äquivalentgewichtsbestimmung gab zwischen den Äquivalentgewichten dieser beiden Säuren liegende Werte.

4 Papierchromatographisches Verhalten der Aminosäuren.

Da papierchromatographische Methoden heute zur Analyse von Eiweißstoffen eine dominierende Rolle spielen, wurde auch das papierchromatographische Verhalten der dargestellten Aminosäuren geprüft. Dabei zeigte es sich, daß ß-Aminosäuren zur Entwicklung der Ninhydrinfärbung eine etwas höhere Temperatur (80-90°) sowie eine längere Entwicklungsdauer (20-30 min) als α-Aminosäuren erfordern.

In der Tabelle sind die in gepuffertem Phenol (p_H 12) und in Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:1) erhaltenen R_f-Werte verzeichnet. Die aufgetragenen Mengen betrugen 30-60 γ Einige bekannte Aminosäuren wurden mitchromatographiert (In Klammern die für diese in der Literatur angegebenen R_f-Werte)

Aminosäure	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Phenol p_H 12	0,26	0,81	0,26	0,65	0,46	0,09 (0,10)	0,32 (0,32)	0,89 (0,89)	
Butanol:Eisessig:Wasser	0,25	0,46	0,25	0,36	0,10	0,18 (0,24)	-	0,59 (0,68)	0,34 (0,43)

Tab.2 R_f-Werte der Aminosäuren

1 ß-Aminobuttersäure; 2 2-Aminocyclopentancarbonsäure;
3 ß-Aminoglutarsäure; 4 α-Amino-γ-oxy-n-valeriansäure;
5 α,γ-Diamino-n-valeriansäure; 6 Asparaginsäure;
7 Glykokoll; 8 Phenylalanin; 9 Prolin

V.) Reaktionen von ß-Aminosäuren.

1.) Darstellung von ß-Aminosäure-Peptiden

Über die Eigenschaften von Peptiden aus ß-Aminosäuren ist bisher nur wenig bekannt. Zwar sind Peptide, die ß-Aminosäuren enthalten, schon in einigen Fällen beschrieben (20), doch handelt es sich dabei ausschließlich um gemischte Peptide von α- und ß-Aminosäuren. Lediglich E. DYER und E. BALLARD (20) synthetisierten ein Dipeptid aus zwei ß-Aminosäuren, ß-Alanyl-ß-phenyl-ß-alanin

Prinzipiell gibt es für die Knüpfung einer Peptidbindung zwei Möglichkeiten. Für die endergonische Bindung zwischen der Carboxyl- und der Aminogruppe muß eine der beiden Komponenten in energiereicher Form vorliegen. Bis vor kurzem wurden alle Peptidbindungen durch Reaktion einer energiereichen Form der betreffenden Carboxylgruppe - meist gemischtes Anhydrid - mit der freien Aminogruppe der zweiten Komponente synthetisiert (21):

$$\text{Säure}_1 + \text{Säure}_2 \longrightarrow \text{gemischtes Anhydrid} + H_2O$$
$$\text{Amin} + \text{gem. Anhydrid} \longrightarrow \text{Säure}_2\text{-amid} + \text{Säure}_1$$
$$\text{Amin} + \text{Säure}_2 \longrightarrow \text{Säure}_2\text{-amid} + H_2O$$

Auch die oben erwähnten Peptide mit ß-Aminosäuren wurden alle nach diesem Schema aufgebaut.

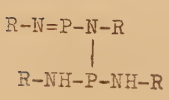
In neuester Zeit wurden insbesondere von St. GOLDSCHMIDT und Mitarbeitern Methoden der Amid- bzw. Peptidverknüpfung beschrieben, die sich von den genannten dadurch unterscheiden, daß nicht die Carboxyl- sondern die Aminogruppe in aktivierter Form zur Reaktion gebracht wird (22):

$$\text{Amin} + \text{Säure}_1 \longrightarrow \text{Säure}_1\text{-amid} + H_2O$$
$$\text{Säure}_2 + \text{Säure}_1\text{-amid} \longrightarrow \text{Säure}_2\text{-amid} + \text{Säure}_1$$
$$\text{Amin} + \text{Säure}_2 \longrightarrow \text{Säure}_2\text{-amid} + H_2O$$

Diese neuen Methoden der Peptidverknüpfung zeichnen sich durch sehr gute Ausbeuten bei geringem experimentellem Aufwand aus.

Für die eigenen Absichten der Synthese von ß-Aminosäurepeptiden bot sich die "Phosphorazamethode" von St. GOLDSCHMIDT und H. LAUTENSCHLAGER an, da sie vom Aminosäureester ausgeht, der ja bei unseren Synthesen zunächst entsteht. Die Aktivierung der Aminogruppe erfolgt hier mit Phosphortrichlorid, das man in Pyridinlösung auf den Aminosäureester einwirken läßt. Dabei bildet sich eine sog. Phosphorazaverbindung:

$$4\ R\text{-}NH_2 + 2\ PCl_3 \xrightarrow{\text{Pyridin}} (RNH\text{-}P{=}N\text{-}R)_2 + 6\ HCl$$

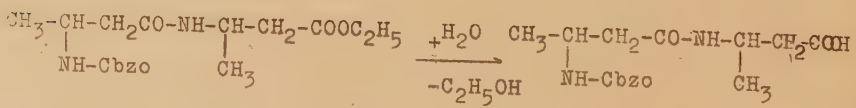


St. GOLDSCHMIDT und H.L. KRAUSS glauben, daß der Phosphorazaverbindung die nebenstehende Struktur zukommt.

Läßt man auf die Phosphorazaverbindung eine Säure einwirken, so erhält man ein Amid, im speziellen Fall einer Aminosäure ein Peptid.

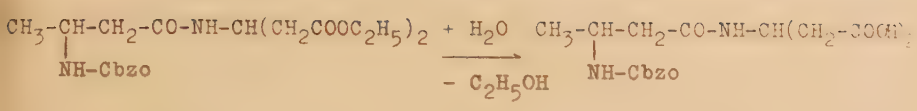
Es zeigte sich, daß diese Methode auch zur Darstellung von ß-Aminosäurepeptiden ausgezeichnet geeignet ist. Mit guten Ausbeuten wurde die Peptidverknüpfung zwischen zwei Molekülen ß-Aminobuttersäure, sowie zwischen einem Molekül ß-Aminobuttersäure und einem Molekül ß-Aminoglutarsäure hergestellt.

Man erhält so N-((ß-Carbobenzoxyamino)-butyryl)-ß-aminobuttersäureäthylester (I) (Fp 94-96°) und N-((ß-Carbobenzoxyamino)-butyryl)-ß-aminoglutarsäurediäthylester (III) (Fp 75°). Beide Verbindungen sind farblose Kristalle, in Wasser schwer-, in Aceton und Essigester leicht löslich. Sie lassen sich bei Raumtemperatur mit 1 n NaOH zu den carbobenzoxylierten Peptiden verseifen.



I

II



III IV

N-((ß-Carbobenzoxyamino)-butyryl)-ß-aminobuttersäure (II), Fp 195°, wird durch Umkristallisation aus Essigester gereinigt· sie löst sich außerdem noch gut in Äthanol und Methanol, in Wasser sowie in Aceton, Chloroform und Benzol ist sie schwerlöslich. N-((ß-Carbobenzoxyamino)-butyryl)-ß-aminoglutarsäure (IV), Fp 168-175° unscharf, ist in Essigester, Benzol, Cyclohexan und Äther schwerlöslich, leichtlöslich dagegen in Wasser, Äthanol und Methanol sowie in Eisessig.

Erstmals dargestellt wurden auch die zu den obigen Synthesen benötigten N-carbobenzoxylierten Verbindungen der ß-Aminobuttersäure (Fp 130°), der ß-Aminoglutarsäure (Fp 161°) sowie der 2-Aminocyclopentancarbonsäure (Fp 145,5-146°) durch Acylierung der Aminosäuren mit Carbobenzoxychlorid in alkalischer Lösung. Die N-Cbzo-Derivate fallen beim Ansauern der Lösung aus und werden durch Umkristallisation aus Chloroform bzw. Essigester gereinigt. Sie kristallisieren in farblosen wasserunlöslichen Nadeln

C) ZUSAMMENFASSUNG.

1.) Asparaginsäure konnte durch katalytische Hydrierung bei erhöhter Temperatur unter Druck mit Raney-Nickel aus Oxalessigester in Gegenwart verschiedener NH_2-Lieferanten (NH_3, NH_2OH, CH_3COONH_4, $H_2N.CO.NH_2$, $H_2N-N(C_6H_5)_2$) dargestellt werden. Die besten Ausbeuten erhält man mit Hydroxylamin (54%) und Ammoniak (25%). Die Reaktionen wurden meist in absolutem Äthanol ausgeführt, nur für die Hydrierung des Oximinobernsteinsäureesters ist Äther vorzuziehen. Sonst konnte ein Einfluß des Lösungsmittels auf die Ausbeuten an Aminoverbindung nicht festgestellt werden. Änderungen des Wasserstoffdrucks von 20-130 atm beeinflussen die Ausbeuten ebensowenig.

2.) Die Übertragung der "Leuckart-Reaktion" auf Oxalessigester wird versucht. Asparaginsäure entsteht dabei nur spurenweise, daneben wird interessanterweise durch Decarboxylierung Alanin gebildet.

3.) Für die Darstellung von Dimethylasparaginsäureester ist die hydrierende Aminierung nicht anwendbar, da Dimethyloxalessigester mit Ammoniak sofort Säurespaltung erleidet. Wir konnten jedoch Dimethyloxalessigester in Gegenwart von Hydroxylamin zum Aminosäureester hydrieren. Bei seiner Verseifung erfolgt schon in der Kälte teilweise Decarboxylierung zu Valin. Papierchromatographisch läßt sich noch eine zweite Aminosäure nachweisen, die vermutlich mit Dimethylasparaginsäure identisch ist.

4.) Es gelingt beim Acetylbrenztraubensäureäthylester, sowohl nur die α-Ketogruppe hydrierend zu aminieren als auch die Umwandlung beider Ketogruppen in Aminogruppen über das bisher unbekannte Dioxim. α-Amino-γ-oxy-n-valeriansäure wurde so dargestellt sowie die bisher nirgends beschriebene α,γ-Diamino-n-valeriansäure.

5.) Im Gegensatz zu bisherigen Angaben gelingt erstmals auch die hydrierende Aminierung von ß-Ketoestern durch Hydrierung mit Raney-Nickel bei 80° und 50-100 atm Wasserstoffdruck.

6.) Nach der unter 5.) angegebenen Methode konnten aus Acetessigester, Acetondicarbonsäureester und Cyclopentanon-(1)-carbonsäure-(2)-äthylester die zugehörigen Aminosäuren, ß-Aminobuttersäure, ß-Aminoglutarsäure und die erstmals dargestellte 2-Aminocyclopentancarbonsäure sowie ihre Ester in guten Ausbeuten erhalten werden. Das papierchromatographische Verhalten der Aminosäuren wird untersucht.
Bei der Hydrierung von ß-Iminobuttersäureester und 2-Iminocyclopentancarbonsäureester entstehen als Nebenprodukte bisher nicht beschriebene sekundäre Amine, die isoliert und als (Di-ß-buttersäure-äthylester)-amin und (Di-2-cyclopentancarbonsäure-äthylester)-amin erkannt wurden.

7.) Die bisher nicht beschriebenen N-Carbobenzoxy-derivate der genannten ß-Aminosäuren werden dargestellt und zu Synthesen von ß-Aminosäurepeptiden nach der Phosphorazamethode benutzt. Dieses bisher nur zur Synthese von α-Aminosäuren angewandte Prinzip der Peptidverknüpfung eignet sich ebensogut zur Darstellung von Peptiden der ß-Aminosäuren. Es wurden dargestellt wurden die Peptidester N-((ß-Carbobenzoxyamino-, butyryl-)-ß-aminobuttersäureäthylester, und N-((ß-Carbobenzoxyamino-)butyryl)-ß-aminoglutarsäure-diäthylester sowie die N-carbobenzoxylierten Peptide.

D) EXPERIMENTELLER TEIL.

I. Darstellung von Asparaginsäure aus Oxalessigester.

1.) Darstellung des Ausgangsmaterials.

210 g (1 Mol) vom käuflichen Natriumenolat des Oxalessigesters werden zu einer auf -10° abgekühlten Mischung von 120 g konz. HCl und 200 g fein gestoßenem Eis gegeben, die sich bereits in einem großen Scheidetrichter befinden. Man überschichtet mit 250 cm^3 Äther und schüttelt so lange, bis das Natriumsalz vollständig in Lösung gegangen ist (15-20 min). Danach zieht man die wässrige Schicht ab und schüttelt sie nochmals mit 100 cm^3 Äther aus. Die vereinigten Ätherauszüge wäscht man wiederholt mit Wasser, bis das Waschwasser fast farblos ist. Die ätherische Lösung des Oxalessigesters wird dann unter häufigem Umschütteln 2 Stunden über frisch geglühtem Natriumsulfat getrocknet, der Äther auf dem Wasserbad, zuletzt am Wasserstrahlvakuum entfernt und der zurückbleibende Oxalessigester an der Ölpumpe destilliert.

$Kp_{0,4\ mm}$: 75 - 78° n_D^{23}: 1,4500

Ausbeute: 134 g entspr. 71% d.Th.

Die Aufarbeitung muß an einem Tag durchgeführt werden, da sonst die Ausbeute stark absinkt.

2.) Ausführung der Hydrierungen.

Die katalytischen Hydrierungen wurden in Stahlautoklaven von 0,25 bzw. 0,5 l Inhalt mit magnetischer Rührvorrichtung und elektrischer Heizung ausgeführt (Herstellerfirma: Andreas Hofer, Mühlheim/Ruhr).

Das als Katalysator verwendete Raney-Nickel wurde aus der käuflichen Ni-Al Legierung 50:50 (Herstellerfirma: Deguasa, Frankfurt a.M.) nach der Vorschrift von R. MOZINGO (23) hergestellt und unter wasserfreiem Methanol aufbewahrt. Die Hydrierungen erfolgten zumeist bei 70-80° und 50-130 atm in verschiedenen meist wasserfreien organischen Lösungsmitteln, bevorzugt in Äthanol. Die Hydrierungsdauer betrug zwei bis sechs Stunden.

3.) Hydrierende Aminierung von Oxalessigester

a) In äthanolischer Lösung.

20 g (0,11 Mol) Oxalessigester wurden mit 40 cm^3 einer alkoholischen Lösung von Ammoniak (0,25 Mol) direkt im Autoklaven zusammengegeben. Unter ziemlicher Erwärmung erstarrte das Gemisch sofort zur breiartigen Masse des Ammoniak-Oxalessigesters. 50 cm^3 abs. Äthanol und etwa 5 g Raney-Nickel wurden hinzugegeben und der gesamte Inhalt mit einem Glasstab gut durchgerührt.

Die Wasserstoffaufnahme entspricht 0,1 Mol, das sind 95% der theoretisch zu erwartenden. Sie begann allmählich bei etwa 70-80°; Nachdem die Temperatur 100° erreicht hatte, wurde die Heizung abgestellt. Die gegenüber den anderen Hydrierungen etwas höhere Temperatur wurde deshalb gewählt, weil der Ammoniak-Oxalessigester bei 83° schmilzt und erst dann vollständig in Lösung geht (Hydrierungsdauer 4 Std.).

Das Lösungsmittel wurde auf dem Wasserbad im Vakuum weggedampft und die zurückbleibende Flüssigkeit der Vakuumdestillation unterworfen. Das Destillat wurde nochmals im Vakuum fraktioniert.

Hauptfraktion: Kp_{12}: 130-134° n_D^{15}: 1,3900
Ausbeute: 5 g Asparaginsäureester entspr. 25% d.Th.

Statt die Komponenten direkt im Autoklaven zusammenzugeben wurde Oxalessigester unter Kühlung mit Eis-Kochsalzmischung zu alkoholischer Ammoniaklösung tropfen lassen. Der dicke Brei wurde wiederum mit abs. Alkohol verdünnt und dann wie oben hydriert. Die Ausbeute an Asparaginsäureester war die gleiche.

b) In wässriger Lösung.

20 g (0,11 Mol) Oxalessigester wurden unter Kühlung mit Eis-Kochsalzmischung zu 0,2 Mol Ammoniak in 100 cm^3 wässriger Lösung zutropfen lassen und unter Zusatz von 2 g $NiSO_4$ mit etwa 4 g Katalysator hydriert.

Die Wasserstoffaufnahme bei 80° betrug nach 1,5 Stunden 50% der theoretisch zu erwartenden.

Nach Absaugen von Katalysator wurde mit 2 n H_2SO_4 schwach angesäuert und ausgeäthert. Die vollständige Verseifung der wässrigen Lösung erfolgte durch fünfstündiges Kochen mit Barytlauge am Rückfluß. Das überschüssige Bariumhydroxyd wurde mit Schwefelsäure gefällt und die Lösung im Vakuum eingeengt. Es blieb ein Sirup zurück, der auch nach wiederholtem Anreiben mit abs. Äthanol nicht kristallisierte.

Die Veresterung des vollständig entwässerten Sirups erfolgte durch Einleiten von HCl bis zur Sättigung in die auf dem Wasserbad erwärmte alkoholische Lösung. Danach wurde noch eine weitere Stunde am Rückfluß gekocht, der Alkohol im Vakuum vollständig entfernt, der Rückstand in wenig kaltem Wasser gelöst und ausgeäthert, um den in geringer Menge mitentstandenen Oxyester abzutrennen.

Das Aminosäureesterhydrochlorid wurde analog der Vorschrift von H. ADKINS (24) auf folgende Weise in den freien Ester umgewandelt:

Zu der in einer Kältemischung gekühlten wässrigen Lösung des Esterhydrochlorids wurde unter Umschütteln 30%ige NaOH bis zur Neutralisation zugetropft und dann gepulvertes wasserfreies Natriumcarbonat zugegeben, bis die wässrige Schicht eine Paste war. Nunmehr wurde die Ätherschicht abgesaugt, der Rückstand mehrfach mit Äther nachgewaschen und die Ätherlösung nach Trocknen über Kaliumcarbonat im Vakuum destilliert

Ausbeute: 4,2 g Asparaginsäureester, entspr. 21% d.Th.
Kp_{15}: 130° n_D^{25}: 1,4383

Darstellung und Hydrierung des Aminofumaresters.

50 g (0,26 Mol) Oxalessigester wurden zu 150 cm^3 einer alkoholischen Ammoniaklösung, die 0,3 Mol NH_3 enthielt, zutropfen lassen, wobei die Temperatur durch Kühlung unter 0° gehalten wurde. Die zu einem weißen Brei erstarrte Masse wurde dann der raschen Vakuumdestillation unterworfen. Nach Entfernen des Alkohols gingen 15 cm^3 Destillat zwischen 120 und 180° bei 12-15 mm über. An den Wänden der Destillationsapparatur sublimierte Ammoniumcarbonat. Bei der Redestillation siedete nach einigen Tropfen Vorlauf die Hauptmenge bei 135°/12 mm.

Ausbeute: 10 g Aminofumarester, entspr. 20% d.Th.

Katalytische Hydrierung des Aminofumaresters

8 g (0,04 Mol) des Esters wurden in 50 cm^3 abs. Äthanol mit 2 g Raney-Nickel hydriert.

Die Wasserstoffaufnahme bei 70-80° entspricht der theoretisch zu erwartenden. Bei der anschließenden Vakuumdestillation siedete die Hauptfraktion von 125-130°/12 mm.

Ausbeute: 6 g Asparaginsäureester, entspr. 75% d.Th.

Verseifung des Esters zur Asparaginsäure

5 g Asparaginsäure-diäthylester wurden in 150 cm^3 Wasser in einem Autoklaven 3 Stunden auf 120-130° erhitzt. Das Wasser wurde im Vakuum bei 40-50° verdampft und der Rückstand mit abs. Alkohol angerieben. Alsbald konnte die Asparaginsäure kristallisiert erhalten werden. Die Kristalle wurden abgesaugt, mit etwas absolutem Alkohol und schließlich mit Äther gewaschen.

Schmelzpunkt: 330° Zers.* (Literatur: 338-339°)
Ausbeute: 2,2 g, entspr. 62% d.Th.

Der zur weiteren Identifizierung herangezogene Vergleich mit käuflicher Asparaginsäure ergab Übereinstimmung der R_f-Werte in wassergesättigtem Phenol.

Hydrierung von Oxalessigester + CH_3COONH_4 in abs. Äthanol.

20 g (0,11 Mol) Oxalessigester und 12 g (0,16 Mol) Ammonacetat wurden in 150 cm^3 abs. Äthanol gelöst und mit 5 g Raney-Nickel im Autoklaven hydriert.

Die Wasserstoffaufnahme begann bei 50°. Die aufgenommene Menge entspricht 0,08 Mol, das sind 70% d.Th. (Temp. 90°, 5 Std.).

Nach Abdampfen des Äthanols wurde in wenig Wasser aufgenommen, 50 cm^3 2 n H_2SO_4 zugesetzt und die Lösung ausgeäthert. Aus der wässrigen Lösung wurde die Schwefelsäure durch einen Überschuß von Barytlauge gefällt und der Bariumsulfatniederschlag abzentrifugiert. Die Verseifung erfolgte mit überschüssiger Barytlauge durch fünstündiges Kochen am Rückfluß. Die Bariumionen wurden mit genau der erforderlichen Menge Schwefelsäure gefällt, die Bariumsulfatniederschläge mit 100 cm^3 Wasser aus-

* Sämtliche Schmelzpunkte sind unkorrigiert. Ihre Bestimmung erfolgte im Kupferblock mit geeichten verkürzten Thermometern.

gekocht und die vereinigten wässrigen Lösungen im Vakuum auf dem Wasserbad eingeengt. Es blieb ein zäher Sirup zurück, aus dem nach mehrmaligem Anreiben mit absolutem Alkohol die Asparaginsäure zur Kristallisation gebracht werden konnte.

Ausbeute: 2, 0 g Asparaginsäure, entspr. 11% d.Th.

Nicht in allen Fällen gelang es, die Asparaginsäure durch Anreiben kristallisiert zu gewinnen. In solchen Fällen wurde die Säure erneut verestert und in der oben beschriebenen Weise aufgearbeitet.

In einigen Versuchen wurde bei der Hydrierung neben Ammonacetat auch noch etwas Ammoniak in äthanolischer Lösung zugefügt. Durchführung der Hydrierung und die Aufarbeitung erfolgten genau wie oben. Auch die Ausbeute war die gleiche.

Druckhydrierung der Oxalessigsäure in Gegenwart von NH_3.

7 g (0,05 Mol) Oxalessigsäure wurden in 50 cm^3 Wasser gelöst und 12 cm^3 konz. wässriger Ammoniak zugetropft. Dazu wurden noch 50 cm^3 Äthanol gefügt und die Lösung nach Zusatz von 5 g Raney-Nickel hydriert.

Die Wasserstoffaufnahme bei 75-80° entsprach der theoretisch zu erwartenden.

Die hydrierte Lösung wurde nach Absaugen vom Katalysator im Vakuum eingeengt, wobei ein grün-blau gefärbter Sirup zurückblieb. Offensichtlich hatte die freie Säure einen Teil des Nickels unter Salzbildung gelöst. Da der Sirup hier wiederum nicht kristallisiert erhalten werden konnte, wurde er in der vorher beschriebenen Weise verestert und aufgearbeitet.

Ausbeute: 2,5 g Asparaginsäureester, entspr. 25% d.Th.

4.) Hydrierung von Oxalessigester in Gegenwart verschiedener NH_2-Lieferanten.

a) Oxalessigester + Urotropin.

20 g (0,11 Mol) Oxalessigester und 10 g (0,07 Mol) Urotropin wurden in 200 cm^3 abs. Äthanol gelöst und mit 5 g Raney-Nickel hydriert. Bei 80-85° betrug die Wasserstoffaufnahme nach einer Hydrierungsdauer von 2 Stunden 0,31 Mol.

Die Reaktionslösung hatte nach der Hydrierung starken Ammoniak- und Trimethylamingeruch. Nach Abdestillation des Lösungsmittels im Vakuum blieben nicht destillierbare Produkte

zurück. Daher wurde der Rückstand mit Wasser und Äthanol aufgenommen, noch 50 cm^3 konzentrierte Salzsäure zugesetzt und 6 Std. auf dem Wasserbad am Rückfluß hydrolysiert. Die Lösung wurde im Vakuum eingedampft, um die überschüssige Salzsäure zu entfernen und das Hydrolysat papierchromatographisch auf Asparaginsäure geprüft, von der Spuren nachgewiesen wurden.

Vollkommen analog und mit gleichem Ergebnis wurde eine Hydrierung in wässrig-alkoholischer Lösung aufgearbeitet.

b) Spaltung des Oxalessigester-diphenylhydrazons.

10 g (0,05 Mol) Oxalessigester und 10 g (0,05 Mol) as. Diphenylhydrazin wurde in absolutem Alkohol gelöst, mäßig erwärmt und nach einstündigem Stehen katalytisch hydriert. Nach einer Hydrierung von 4 Stunden bei 80° waren 0,09 Mol Wasserstoff aufgenommen worden.

Bei der Vakuumdestillation ging von 120-140°/12 mm ein Gemisch des Äpfelsäurediäthylesters und des Asparaginsäureesters über. Ein Teil des Gemisches wurde mit HCl angesäuert und ausgeäthert, die Ätherlösung eingedampft und der Rückstand mit HCl verseift. Die isolierte Äpfelsäure besaß nach einmaliger Umkristallisation einen Schmelzpunkt von 120-123° (Äpfelsäure 125-126°). Mischschmelzpunkt mit Äpfelsäure 120-125°.

Aus dem anderen Teil der Lösung wurde der Aminosäureester als Oxalat gefällt (1,1 g, entspr. 18% d.Th.). Verseifung ergab Asparaginsäure.

c) Versuch der Reduktion von Harnstoff-bis-Oxalessigester.

10 g (0,025 Mol) Harnstoff-bis-Oxalessigester wurden mit 20 g Aluminiumamalgam in Äthanol zehn Stunden bei Raumtemperatur auf der Maschine geschüttelt. Nach Abfiltrieren von Al-Amalgam wurde die äthanolische Lösung im Vakuum eingedampft. Es blieb ein Sirup zurück, der beim Kühlen in Eis-Kochsalzmischung kristallisierte. 6 g des Ausgangsmaterials konnten so zurückerhalten werden. Der Sirup wurde mit Bariumhydroxyd in wässrig alkoholischer Lösung verseift und papierchromatographisch die Bildung geringer Mengen Asparaginsäure nachgewiesen. Beim Versuch der katalytischen Hydrierung bei 80° konnte weder Asparaginsäure nachgewiesen werden, noch gelang es, einen Teil des Ausgangsmaterials kristallisiert zurückzuerhalten.

d) Darstellung von Asparaginsäureester aus Oxalessigester + Hydroxylamin.

40 g (0,19 Mol) Na-Oxalessigester werden mit 20 g (0,29 Mol) Hydroxylaminchlorhydrat und etwas $BaCO_3$ in 40 cm^3 Wasser eine Stunde auf der Maschine geschüttelt. Dann wird die Lösung zentrifugiert, vom Niederschlag dekantiert und zweimal mit je 50 cm^3 Äther ausgeschüttelt. Die ausgeätherte Menge beträgt 26 g, das sind 0,13 Mol bezogen auf Oximinobernsteinsäureester. Die ätherische Lösung des Oximinoesters wird über geglühtem Na_2SO_4 getrocknet und anschließend direkt hydriert, da sich der Ester, ein rotbraunes Öl, nicht im Vakuum destillieren läßt und auch keine Neigung zeigt zu kristallisieren.

Die Wasserstoffaufnahme betrug 0,2 Mol, das sind 80% d.Th. Die Hydrierung begann bei etwa 65° und verlief bei 70° ruhig bis zu Ende.

Nachdem sich die Lösung wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt hatte, wurde vom Katalysator abgesaugt, der Äther verdampft und die zurückbleibende Menge der Vakuumdestillation unterworfen. Nach wenig Vorlauf siedete die Hauptmenge von 101-103°/1 mm.

Ausbeute: 13 g Asparaginsäureester, entspr. 54% d.Th.

5.) Übertragung der "Leuckart-Reaktion" auf Oxalessigester.

10 g (0,05 Mol) Oxalessigester wurden mit 50 cm^3 Formamid und 1 g Raney-Ni 60 Std. bei 90° und 7 Std. bei 160° gehalten. Nach dem Zusammengeben der beiden Komponenten färbte sich die Lösung von gelb über violett nach tief-dunkelrot. Nach dem 67-stündigen Erhitzen war das Reaktionsgemisch braunschwarz gefärbt. Ein Teil wurde mit HCl verseift und papierchromatographisch auf Asparaginsäure geprüft. Das Ergebnis war negativ.

Eine Probe wurde ausgeäthert, sie gab mit $FeCl_3$ in wässrig-alkoholischer Lösung erst allmählich die Enolreaktion des Oxalessigesters. Daher wurde vermutet, daß die Ketogruppe des Oxalessigesters mit der NH_2-Gruppe des Formamids reagiert hatte und versucht, durch katalytische Hydrierung und anschließende Hydrolyse doch nicht Asparaginsäure zu erhalten. Jedoch war das Ergebnis auch jetzt negativ.

Bei einem zweiten Ansatz wurden noch 10 cm^3 93%iger Ameisensäure zugesetzt und 24 Std. auf 190° erhitzt (Badtemperatur).

Darauf wurde die Lösung 3 Stunden am Rückfluß mit konz. HCl verseift. Die bei Zugabe der Salzsäure ausfallende Additionsverbindung von HCl an Formamid wurde vor der Hydrolyse abgesaugt. Papierchromatographische Untersuchung ergab die Bildung von Spuren Asparaginsäure sowie 3% Alanin.

Bildung und Isolierung des 3,6-Dioxopiperazin-diessigsäure(2,5)-diäthylesters.

Läßt man Asparaginsäureester bei Zimmertemperatur stehen, so scheidet sich nach mehreren Wochen ein farbloser Kristallkuchen ab. Dieser wird vom anhaftenden Ester durch kräftiges Absaugen weitgehend befreit und die Kristalle mehrfach mit Äther gewaschen. Beim Umkristallisieren aus Wasser erhält man glänzende farblose Blättchen. Nach nochmaliger Kristallisation aus Wasser, Waschen mit Alkohol und Äther schmelzen sie bei 195-196° Zur Analyse wurde die Substanz 3 Std. im Vakuum bei 60° über Phosphorpentoxyd getrocknet.

Analyse:	$C_{12}H_{18}O_6N_2$	(286,3)*	
ber.:	C 50,34	H 6,34	N 9,79
gef.:	50,37	6,26	10,14

II. Versuche mit Dimethyloxalessigester

1.) Darstellung des Dimethyloxalessigsäure-diäthylesters

Der Dimethyloxalessigsäurediäthylester wurde durch Einwirkung von Oxalessigester auf die Grignardverbindung des α-Bromisobuttersäureäthylester nach E. VOGEL und H. SCHINZ (25) dargestellt.

2,4-Dinitrophenylhydrazon des Dimethyloxalessigesters

0,5 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurde in 1 cm³ warmer konz. Schwefelsäure gelöst und mit 5 cm³ abs. Äthanol verdünnt. Dazu wurden in der Wärme 0,5 g Dimethyloxalessigester gefügt und kurz aufgekocht. Beim Abkühlen schied sich das 2,4-Dinitrophenylhydrazon in gelben Nadeln aus, die abgesaugt und mit wenig kaltem Alkohol und dann mit Äther gewaschen wurden Fp.: 158-159,5°.

* Die C,H und N-Analysen wurden als Mikrobestimmungen von Dr.Ing.A. Schoeller Kronach/Ofr. ausgeführt, sofern nicht anders vermerkt.

Ausbeute: 0,8 g 2,4-Dinitrophenylhydrazon, entspr. 80% d.Th.
Analyse: $C_{16}H_{20}O_8N_4$ (396,4)

ber.:	C	48,48	H	5,09	N 14,13
gef.:		48,53		5,23	14,12

Reaktion zwischen Dimethyloxalessigester und Ammoniak.

Gibt man zu Dimethyloxalessigester das gleiche Volumen einer alkoholischen NH_3-Lösung, so fällt nach 5-10 Minuten allmählich ein ganz schwach gelblich gefärbter Niederschlag aus. Dieser wird auf der Nutsche abgesaugt, erst mit Alkohol und schließlich mit Äther gewaschen.

Die Substanz reagiert neutral, besitzt keinen Schmelzpunkt und enthält Stickstoff. Sie ist in allen organischen Lösungsmitteln unlöslich, läßt sich jedoch aus Wasser umkristallisieren. Beim Behandeln mit Natronlauge entwickelt sich nach einiger Zeit Ammoniak. Nach der Verseifung läßt sich Oxalsäure nachweisen. Es handelt sich um Oxalsäurediamid, wie auch durch die Stickstoffbestimmung bestätigt wurde.

Analyse: $C_2H_4O_2N_2$ (88)

13,2 mg Substanz gaben 3,55 cm^3 Stickstoff bei 18° und 752 Torr (eigene Best.)

ber.:	N	31,8
gef.:		31,2

Überführung des α-Oximino-ß,ß-dimethylbernsteinsäure-diäthylesters in den Aminosäureester:

10 g Dimethyloxalessigester (0,05 Mol) wurden mit dem vierfachen Überschuß einer äthanolischen Lösung von freiem Hydroxylamin (50 cm^3) 2 Stunden auf dem Wasserbad am Rückfluß erwärmt und anschließend mit 3 g Raney-Nickel hydriert.

Die Wasserstoffaufnahme entspricht 90% d.Th.
Der Katalysator wurde abgesaugt, das Lösungsmittel im Vakuum verdampft und der Rückstand der Vakuumdestillation unterworfen. Die Fraktion von 115-130°/12 mm wurde aufgefangen und nochmals fraktioniert. So konnten 3,5 cm^3 des Aminosäureesters erhalten werden. Bei der ersten Destillation blieben viel verharzte Rückstände im Kolben zurück.

Zur Trennung von Verunreinigungen wurde der Aminosäureester mit einer gesättigten Lösung von Oxalsäure in Aceton als Oxalat

gefällt, abgesaugt, gewaschen und getrocknet Fp 191-191,5°

Analyse: $C_{22}H_{40}O_{12}N_2$ (524,6)

43,1 mg Substanz gaben 2,10 cm^3 Stickstoff bei 755 Torr und 20° C (eigene Bestimmung).

ber.: N 5,34
gef.: 5,6

Verseifung des Aminosäureester-oxalates.

2 g Dimethylasparaginsäureester-oxalat wurde mit 30 cm^3 einer gesättigten wässrigen Bariumhydroxydlösung 5 Stunden am Rückfluß verseift. Nach Beendigung der Hydrolyse wurde zunächst vom abgeschiedenen Bariumoxalat abgesaugt und dann die überschüssigen Bariumionen mit genau der berechneten Menge 2 n H_2SO_4 gefällt. Der Bariumsulfatniederschlag wurde mit 50 cm^3 Wasser ausgekocht und die vereinigten wässrigen Lösungen im Vakuum auf dem Wasserbad eingeengt. Es blieb eine Aminosäure zurück, die zunächst für die Dimethylasparaginsäure gehalten wurde. Die Analyse des Additionsproduktes an α-Naphthylisocyanat ergab jedoch auf Valin stimmende Werte:

Analyse: $C_{16}H_{18}O_3N_2$ (286,3)

ber.:	C 67,12	H 6,34	N 9,78
	67,10	6,41	9,63

Farblose Nadeln. Fp 186-187°.

Der papierchromatographische Vergleich der Aminosäure mit Valin in Phenol p_H 1 ergab Übereinstimmung der R_f-Werte.

Eine weitere Hydrolyse wurde 24 Std. bei Raumtemperatur mit gesättigter wässriger Barytlauge ausgeführt. Nach Entfernung der Bariumionen mit H_2SO_4 wurde die Lösung papierchromatographisch analysiert. Neben Valin konnte eine Aminosäure von annähernd gleichem R_f-Werte wie Asparaginsäure nachgewiesen werden. Hierbei dürfte es sich um ß,ß-Dimethylasparaginsäure handeln.

III. Hydrierende Aminierung von Acetylbrenztraubensäure-äthylester.

Darstellung des Ausgangsmaterials.

Acetylbrenztraubensäureäthylester wurde durch Kondensation von Aceton mit Oxalsäurediäthylester nach der Vorschrift von C.S. MARVEL und E.E. DREYER (26) dargestellt.

1.) α-Imino-γ-keto-n-valeriansäureester.

140 g (0,9 Mol) Acetylbrenztraubensäureäthylester wurde in 200 cm^3 Äther gelöst und unter Kühlung mit Eis-Kochsalzmischung Ammoniak eingeleitet, bis sich kein weiterer Niederschlag mehr bildete. Danach wurde das NH_3-Addukt von der Ätherlösung abgesaugt und im Vakuumexsikkator völlig vom Lösungsmittel befreit.

Ausbeute: 150 g, entspr. 97% d.Th.

Man erwärmt 130 g der Additionsverbindung 10 Minuten im siedenden Wasserbad auf 80-100°, wobei die Masse sich verflüssigt. Dann kühlt man auf Raumtemperatur ab, versetzt mit H_2O und kühlt die Lösung unter wiederholtem Umschütteln stark ab. Der auskristallisierte α-Imino-γ-keto-n-valeriansäureester wird durch kräftiges Absaugen von anhaftendem Wasser und nicht kristallisierten Anteilen befreit. Die Kristalle wäscht man mit wenig eiskaltem Essigester und trocknet den Iminoester zwischen Filterpapier. Zur Reinigung kristallisiert man nochmals aus Essigester um.

Ausbeute: 60 g, entspr. 52% d.Th. Fp.: 38°

Durch Aufarbeitung der Mutterlaugen erhält man noch eine zweite Fraktion.

α-Amino-γ-oxy-n-valeriansäureester.

10 g (0,06 Mol) des Iminoesters wurden in 50 cm^3 abs. Äthanol mit 10 g Raney-Nickel hydriert. Nach einer Hydrierungsdauer von 3 Stunden bei 80° war die theoretische Wasserstoffmenge aufgenommen.

Das Hydrierungsprodukt riecht aminartig. Da sich der Ester nicht im Vakuum destillieren läßt, wurde der äthanolischen Lösung nach Abzentrifugieren vom Katalysator Wasser zugesetzt und 6 Stunden am Rückfluß gekocht.

Der nach Vertreiben der Lösungsmittel im Vakuum zurückbleibende Sirup wurde mit Wasser aufgenommen und mittels eines Kationenaustauschers (Amberlite IR 120) von den Verunreinigungen getrennt. Nach gründlichem Auswaschen mit H_2O wurde die in der Austauschersäule befindliche Aminosäure mit 2 n NH_3 eluiert, wobei die Ninhydrinreaktion zur Erkennung der Aminosäurefraktion diente. Auf Zugabe von absolutem Äthanol zur eingeengten Lösung kristallisierte die Aminosäure aus.
Fp.: 205° (Zers.) nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthanol-Wasser (Lit.: Fp "gegen 212° bei raschem Erhitzen").

Ausbeute: 1,5 g entspr. 15% d.Th.
Analyse: $C_5H_{11}O_3N$ (133)
29,5 mg Substanz gaben 2,75 cm^3 Stickstoff bei 18° und 750 mm Hg (eigene Bestimmung).

ber.: N 10,5
gef.: 10,8

Nimmt man die Hydrierung bei 100° vor, so kristallisiert nach Entfernung des Lösungsmittels vor der Hydrolyse bereits ein Teil des Rückstandes aus. Wenn man die Kristalle vom anhaftenden Sirup befreit, zeigen sie nach Umkristallisation aus Äthanol einen Schmelzpunkt von 213-215°. Sie reagieren neutral, enthalten Stickstoff und geben keine Ninhydrinreaktion. Es handelt sich um das Diketopiperazin des α-Amino-γ-oxy-n-valeriansäureester, was auch durch die Stickstoffbestimmung bestätigt werden konnte.

Analyse: $C_{10}H_{18}O_4N_2$ (230)
30,6 mg Substanz gaben 3,25 cm^3 N_2 bei 17° und 745 Torr (eigene Bestimmung).

ber.: N 12,2
gef.: 12,1

Hydrierung des Iminoesters bei Raumtemperatur war nicht möglich. Es fand keine Wasserstoffaufnahme statt. Das Ausgangsmaterial konnte zurückerhalten werden.

α,γ-Dioximino-n-valeriansäureäthylester.

20 g (0,13 Mol) Acetylbrenztraubensäureäthylester wurden mit 40 g Hydroxylaminchlorhydrat (0,58 Mol) und 100 cm^3 Pyridin in 200 cm^3 abs. Äthanol zwei Stunden am Rückfluß erhitzt

(Wasserbad). Zur Isolierung des Dioximinoesters werden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit Wasser digeriert und ausgeäthert. Nach Verdunsten des Äthers bleiben farblose Kristalle zurück, die man zur Reinigung aus Essigester umkristallisiert. Fp.: 130°.

Ausbeute: 14,5 g, entspr. 65% d.Th.

Analyse: $C_8H_{12}O_4N_2$ (188,2)

ber.:	C	44,68	H	6,43	N 14,86
gef.:		44,94		6,50	15,20

α,γ-Diamino-n-valeriansäure.

Man löst 5 g Dioximinovaleriansäureester (0,027 Mol) in 70 cm^3 abs. Äthanol und hydriert mit 5 g Raney-Nickel. Nach einer Hydrierungszeit von 3 Stunden bei 80-100° waren 0.092 Mol Wasserstoff aufgenommen worden.

Das aminartig riechende Hydrierungsprodukt wird bei 40-45° im Vakuum vom Äthanol befreit, der ölige Rückstand mit wässriger Salzsäure aufgenommen und 7 Stunden am Rückfluß auf dem Wasserbad erhitzt. Nachdem man die Lösung im Vakuum eingeengt hat, nimmt man den Rückstand in Wasser auf und gibt solange Silbercarbonat hinzu, als noch CO_2-Entwicklung stattfindet. Darauf schüttelt man noch eine Stunde auf der Maschine, saugt ab und leitet in das warme Filtrat Schwefelwasserstoff ein, bis alles Silber gefällt ist. Das Silbersulfid wird abgesaugt und das Filtrat im Vakuum eingeengt, wobei man etwa sich noch abscheidenden Schwefel abtrennt. Nach mehrmaligem Anreiben mit Äther und Trocknen im Vakuumexsikkator wird das Produkt fest und läßt sich pulvern. Es gibt eine positive Ninhydrinreaktion und ist sehr hygroskopisch; beim Stehen an der Luft zerfließt es nach kurzer Zeit. Bei Erwärmen der wässrigen Lösung mit einer gesättigten Pikrolonsäurelösung fällt beim Abkühlen das gelbe, in Wasser schwerlösliche Pikrolonat vom Schmelzpunkt 190°.

IV.) Über die hydrierende Aminierung von ß-Ketoestern.

a) Hydrierung des ß-Aminocrotonsäureesters.

In 26 g (0,2 Mol) Acetessigester wurde bei Raumtemperatur Ammoniak bis zur Sättigung eingeleitet. Darauf wurde das entstandene Wasser abgetrennt, die Esterschicht über Natriumsulfat getrocknet und die Hydrierung in 50 cm^3 abs. Äthanol mit 5 g Katalysator ausgeführt.

Die Wasserstoffaufnahme bei 80-100° beträgt nach 4 Stunden 0,16 Mol, entsprechend 80% d.Th. Nach Abzentrifugieren des Katalysators wurde die Lösung im Vakuum destilliert. Die Hauptfraktion siedete von 60-70°/13 mm und betrug 17 cm^3, entspr. 65% d.Th. n_D^{17}: 1,4274.

Der so erhaltene ß-Aminobuttersäureester wurde durch eine gesättigte Lösung von Oxalsäure in Aceton gefällt.

Ausbeute: 20 g Oxalat, entspr. 58% d.Th. bezogen auf Acetessigester.

Zur Analyse wurde die Verbindung aus Aceton-Methanol umkristallisiert. Man erhält so glänzende weiße Blättchen vom Schmelzpunkt 193,5°.

Analyse: $C_{14}H_{28}O_8N_2$ (352,2)

ber.:	C	47,70	N	8,01	H 7,95
gef.:		47,63		7,98	8,30

b) Verseifung des Oxalats zur ß-Aminobuttersäure

5 g ß-Aminobuttersäureester-oxalat wurden mit einer gesättigten wässrigen Bariumhydroxydlösung 5 Stunden am Rückfluß gekocht. Das überschüssige Bariumhydroxyd wurde mit 2 n H_2SO_4 quantitativ gefällt und der Bariumhydroxydniederschlag mit Wasser ausgekocht. Nach Abdampfen des Wassers im Vakuum blieb die ß-Aminobuttersäure als strahlig kristalline Masse zurück. Fp.: 184-185°.

Ausbeute: 1,4 g ß-Aminobuttersäure, entspr. 78% d.Th.

Bei späteren Ansätzen wurde nicht mehr das Oxalat dargestellt, sondern der ß-Aminobuttersäureester direkt in wässr.-alkoholischer Lösung verseift, wie im folgenden für die anderen ß-Aminosäuren beschrieben. Dadurch konnte die Ausbeute an ß-Aminobuttersäure noch erhöht werden.

c) Isolierung des (Di-ß-buttersäure-äthylester)-amins.

Bei der Vakuumdestillation des ß-Aminobuttersäureesters wurden 6 cm^3 Nachlauf erhalten, die bei 170°/14 mm übergingen. Die vereinigten Nachläufe mehrerer Hydrierungen wurden an der Ölpumpe fraktioniert. Kp.: 145-149°/1 mm. Mit einer gesättigten Lösung von Oxalsäure in Aceton fiel nach kurzer Zeit der farblose Niederschlag des Oxalates aus. Da sich das Oxalat jedoch nur sehr schlecht umkristallisieren ließ, wurde das Amin selbst analysiert.

Analyse: $C_{12}H_{23}O_4N$ (245,3)

ber.:	C	58,75	H	9,45	N 5,71
gef.:		58,97		8,80	5,48

2.) 2-Aminocyclopentancarbonsäure.

a) Darstellung des Cyclopentanon-(1)-carbonsäure-(2)-äthylesters

Die Darstellung dieser Verbindung erfolgte durch intramolekulare Kondensation des Adipinsäurediäthylesters nach P.S. PINKNEY (27)

b) Hydrierende Aminierung des Cyclopentanoncarbonsäureesters.

Zu 50 g (0,32 Mol) Cyclopentanoncarbonsäureester tropft man unter Kühlung 70 cm^3 konz. äthanolische NH_3 und läßt die Lösung dann bei Raumtemperatur stehen. Die nach kurzer Zeit auskristallisierte Additionsverbindung geht nach etwa 10 Stunden wieder vollständig in Lösung, wenn man wiederholt gut durchschüttelt. Man läßt die Lösung noch zwei Tage bei Raumtemperatur stehen und entfernt dann Äthanol und Ammoniak im Vakuum. Beim Abkühlen kristallisiert der Iminoester aus. Durch kräftiges Absaugen befreit man ihn von der Mutterlauge und reinigt ihn durch Umkristallisation. Durch Behandeln des abgetrennten Öles mit Ammoniak erhält man noch eine zweite Fraktion Iminoester.

Ausbeute: 38 g Iminoester, entspr. 77% d.Th.

c) 2-Aminocyclopentancarbonsäureester.

Man löst 30 g Iminoester (0,11 Mol) in 50 cm^3 Äthanol und hydriert mit 10 g Raney-Nickel. Wichtig ist, daß man den Katalysator ganz frisch bereitet, da man andernfalls nur geringe

Ausbeuten an Aminoester erhält. Nach einer Hydrierungsdauer von 3 Stunden bei 80° ist die theoretische Wasserstoffmenge (0,17 Mol) aufgenommen.

Ausbeute: 25,5 g, entspr. 85% d.Th.

Abtrennung des Aminoesters durch Vakuumdestillation. Farblose Flüssigkeit. Kp_{12}: 100-102°. n_D^{22}: 1,4601. Leicht löslich in Alkohol, Äther, Aceton; schwer löslich in H_2O.

Analyse: $C_8H_{15}O_2N$ (157,22)

ber.:	C	61,12	H	9,55	N 8,91
gef.:		61,10		9,41	8,80

Oxalat.

Mit Oxalsäure in Aceton fällt sofort das schwerlösliche Oxalat aus. Farblose, glänzende Kristalle. Fp.: 192°. Das Oxalat wurde aus Aceton-Methanol umkristallisiert.

Analyse: $C_{18}H_{32}O_8N_2$ (404,5)

ber.:	C	53,45	H	7,98	N 6,93
gef.:		53,23		7,76	6,86

d) 2-Aminocyclopentancarbonsäure.

12 g Aminoester wurden mit 30 cm^3 Wasser und 20 cm^3 Äthanol 8 Std. am Rückfluß gekocht. Beim Abkühlen der Lösung kristallisierte bereits 3,3 g Aminosäure aus, beim Einengen der Lösung wurden weitere 6,2 g erhalten.

Ausbeute: 9,5 g, entspr. 92% d.Th.

Die Aminosäure kristallisiert mit einem Mol Kristallwasser, das erst im Vakuum über Phosphorpentoxyd bei 110° abgegeben wird.

Kristallwasserbestimmung: 403,6 mg Aminosäure gaben 50,6 mg Wasser ab (110°, 0,03 Torr).

$C_6H_{11}O_2N.H_2O$ (147,18)

ber.:	H_2O	12,25
gef.:		12,50

Die aus H_2O-Äthanol umkristallisierte analysenreine Aminosäure hatte einen Schmelzpunkt von 242° (Zers.).

Analyse: $C_6H_{11}O_2N.H_2O$ (147,18)

ber.:	C	48,98	H	8,90	N 9,52
gef.:		49,08		8,85	9,64

e) (Di-2-cyclopentancarbonsäure-(1)-äthylester)-amin.

Bei der Hydrierung des Iminocyclopentancarbonsäureesters entsteht wiederum ein höhersiedendes Produkt, das sekundäre Amin obiger Formel. $Kp_{0,05}$: 140-142° n_D^{26}: 1,5132.

Analyse: $C_{16}H_{27}O_4N$ (192,2)

ber.:	C	64,62	H	9,15	N 4,71
gef.:		65,04		8,75	4,58

3.) ß-Aminoglutarsäure.

a) Darstellung des Ausgangsmaterials.

Acetondicarbonsäurediäthylester wurde durch CO-Abspaltung aus Citronensäure nach R. ADAMS, H.M. CHILES und C.F. RASSWEILER (28) dargestellt.

b) ß-Iminoglutarsäurediäthylester.

Der ß-Iminoglutarsäurediäthylester wurde durch Zutropfen von abs. äthanolischer Ammoniaklösung zu Acetondicarbonsäureester dargestellt, entsprechend der Vorschrift von W.O. EMERY (19). Aus 50 g Acetondicarbonsäurediäthylester wurden 31 g ß-Iminoglutarester erhalten, einer Ausbeute von 62% d.Th. entsprechend.

$Kp_{0,4}$: 114-116° n_D^{20}: 1,4972.

c) ß-Aminoglutarsäurediäthylester.

13 g (0,065 Mol) ß-Iminoglutarester wurden in 50 cm^3 abs. Alkohol gelöst und mit 5 g frischem Raney-Nickel hydriert, wobei die Wasserstoffaufnahme nach dreistündiger Hydrierung bei 70-80° 0,065 Mol entsprach.

Die Wasserstoffaufnahme entspricht der theoretisch zu erwartenden. Nach Abzentrifugieren des Katalysators wurde der Alkohol am Wasserstrahlvakuum entfernt und der zurückbleibende ß-Aminoglutarsäurediäthylester an der Ölpumpe destilliert.

$Kp_{0,4}$: 93-96°, n_D^{19}: 1,4430.

Ausbeute: 11 g, entspr. 85% d.Th.
Farblose, schwach aminartig riechende Flüssigkeit.

Analyse: $C_9H_{17}O_4N$ (203,3)

ber.:	C	53,17	H	8,43	N 6,89
gef.:		53,13		8,39	6,42

d) ß-Aminoglutarsäure.

3 g (0,015 Mol) ß-Aminoglutarsäurediäthylester wurden mit 20 cm^3 Wasser acht Stunden am Rückfluß auf dem Wasserbad hydrolysiert. Beim Erkalten der Lösung kristallisierte bereits ein Teil der Aminosäure aus. Eine weitere Fraktion wurde durch Einengen der Mutterlauge erhalten. Fp 275-277° (Zers.) (GOOTJES: 276-280°).

Ausbeute: 2 g, entspr. 94% d.Th.

Hydrierende Aminierung von Acetondicarbonsäure.

14,6 g (0,1 Mol) Acetondicarbonsäure wurden mit 30 cm^3 konz. NH_3 (0,36 Mol), die auf 100 cm^3 verdünnt waren, unter Kühlung versetzt. Die Hydrierung erfolgte mit 5 g frischem Raney-Nickel bei 80-90°. Nach 4 Stunden waren 0,08 Mol Wasserstoff aufgenommen worden.

Schon beim Zutropfen von Ammoniak erfolgte teilweise Decarboxylierung. Nach der Hydrierung wurde das überschüssige Ammoniak und ein Teil des Wassers im Vakuum entfernt. Aus dem Ammoniumsalz wurden mittels Ionenaustauscher (Amberlite IR 120) die Säuren freigemacht und die wässrige Lösung auf dem Wasserbad im Vakuum eingedampft. Die zurückbleibenden Säuren enthielten jedoch keinen Stickstoff mehr. Sie wurden nach völliger Entwässerung mit 1/1o n NaOH gegen Phenolphthalein titriert.

188,0 mg Säure verbrauchten 22,2 cm^3 1/10 n NaOH (Phenolphthalein)
Äquivalentgewicht: 85.

V.) N-Carbobenzoxyaminosäuren.

Zur Carbobenzoxylierung wurden die ß-Aminosäuren in überschüssiger 2n NaOH gelöst und unter guter Kühlung und kräftigem Rühren abwechselnd Carbobenzoxychlorid in Toluol und 2 n NaOH innerhalb 30 Minuten zugetropft. Danach wurde die Lösung noch 45 Minuten gerührt und dann unter guter Kühlung mit konz. HCl

kongosauer gemacht. Die ausgeschiedene Carbobenzoxyverbindung wurde abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen, getrocknet und umkristallisiert.

N-Cbzo-ß-aminobuttersäure.

Ansatz: 5 g (0,05 Mol) ß-Aminobuttersäure in 30 cm^3 2 n NaOH gelöst, 15 g Carbobenzoxychlorid in Toluol und 10 cm^3 2n NaOH zugetropft.

Ausbeute: 9 g Cbzo-Aminosäure, entspr. 78% d.Th.
Nadeln (aus Chloroform) Fp.: 130°.

Analyse: $C_{12}H_{15}O_4N$ (237,3)

ber.:	C	60,75	H	6,37	N 5,90
gef.:		60,80		6,50	5,99

N-Cbzo-2-aminocyclopentancarbonsäure.

Ansatz: 4 g 2-Aminocyclopentancarbonsäure (0,03 Mol) in 20 cm^3 2 n NaOH gelöst, 10 g Carbobenzoxychlorid in Toluol und 10 cm^3 2 n NaOH zugetropft.

Ausbeute: 6,5 g Cbzo-Aminosäure, entspr. 80% d.Th.
Farblose Nadeln (aus Essigester) Fp.: 145,5-146°. In Chloroform, Essigester und Aceton leicht löslich, schwer löslich in Wasser.

Analyse: $C_{14}H_{17}O_4N$ (263,3)

ber.:	C	63,86	H	6,51	N 5,32
gef.:		63,91		6,42	5,46

N-Cbzo-ß-aminoglutarsäure.

Ansatz: 5 g ß-Aminoglutarsäure in 30 cm^3 2 n NaOH gelöst, 15 g Carbobenzoxychlorid und 10 cm^3 2 n NaOH zugetropft.

Ausbeute: 6 g Cbzo-Aminosäure, entspr. 64% d.Th.
Nadeln (aus Essigester) Fp.: 161°. Leicht löslich in Aceton und Essigester, schwerlöslich in Chloroform und Wasser.

Analyse: $C_{14}H_{17}O_4N$ (281,3)

ber.:	C	55,52	H	6,51	N 5,32
gef.:		55,28		6,42	5,46

Peptide von ß-Aminosäuren.

Voraussetzung für das Gelingen der Reaktion ist die vollständige Ausschaltung von Wasser, daher sind alle Lösungsmit-

tel und Reagenzien sorgfältig zu trocknen.

Zur Lösung des ß-Aminosäureesters in Pyridin tropft man bei 0° die Lösung von Phosphortrichlorid (über Dimethylanilin destilliert) in Pyridin. Pyridinhydrochlorid scheidet sich ab Nach 1/2 Stunde erhitzt man die Lösung zusammen mit der Cbzo-Aminosäure 3 Stunden auf dem Ölbad auf 100° Von etwa entstandenen flockigen braunen Niederschlag dekantiert man ab und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wird mit 10%iger Sodalösung digeriert und gekühlt Nach 1-2 Stunden wird die zunächst ölige Masse fest. Man saugt ab, wäscht mit Wasser nach, trocknet im Exsikkator und kristallisiert um.

Den so erhaltenen N-Cbzo-Peptidester verseift man mit der äquivalenten Menge 1 n NaOH durch Schütteln bei Raumtemperatur Die vollständige Hydrolyse erkennt man am Klarwerden der Lösung nach etwa 2 Stunden. Man filtriert von geringen Trübungen ab und säuert unter guter Kühlung mit konz. HCl vorsichtig an (kongosauer) Das ausgeschiedene N-Cbzo-Dipeptid wird [illegible] gewaschen und nach Trocknen im Vakuum umkristallisiert

N-((ß-Carbobenzoxyamino)-butyryl)-ß-aminobuttersäure-äthylester (I)

Ansatz: 4,4 g ß-Aminobuttersäureäthylester (0,033 Mol) in 30 cm^3 abs Pyridin gelöst. Dazu 2,27 g (0,016 Mol) PCl_3 in 10 cm^3 abs. Pyridin. Nach 30 min wurden 7 g (0,03 Mol) Cbzo-ß-Aminobuttersäure zugegeben und am Rückfluß 4 Std auf 100° erhitzt

Ausbeute: 8 g I, entspr. 73% d.Th.
Farblose Kristalle (aus Essigester-Petroläther) Fp : 95-96°

Analyse: $C_{18}H_{26}O_5N_2$ (350,4)

ber.:	C	61,70	H	7,48	N 7,99
gef.:		61,15		7,34	7,94

N-((ß-Carbobenzoxyamino)-butyryl)-ß-aminobuttersäure (II)

Ansatz: 3,6 g I 2 Stunden mit 10 cm^3 1n NaOH auf der Maschine geschüttelt und mit konz. HCl unter Eiskühlung angesäuert

Ausbeute: 3,2 g II, entspr. 97% d.Th.
Farblose Kristalle (aus Essigester) Fp.: 195°

Analyse: $C_{16}H_{22}O_5N_2$ (322,4)

ber.:	C	59,61	H	6,88	N 8,69
gef.:		59,66		6,94	8,[illegible]

N-((ß-Carbobenzoxyamino)-butyryl)-ß-aminoglutarsäure-diäthylester. (III).

Ansatz: 5,5 g ß-Aminoglutarsäurediäthylester (0,033 Mol) werden in 30 cm^3 abs. Pyridin gelöst. Dazu tropft man 2,27 g (1,45 cm^3 0,016 Mol) Phosphortrichlorid in 10 cm^3 abs. Pyridin. Nach 30 min. werden 7 g (0,03 Mol) Cbzo-ß-aminobuttersäure zugegeben und das Reaktionsgemisch drei Stunden auf 100° gehalten (Ölbad).

Ausbeute: 10, 4 g, entspr. 83% d.Th.
farblose Kristalle (aus Äther) Fp. 75°, löslich in Aceton, Chloroform, Essigester, Methanol und Äthanol. In Äther in der Kälte schwerlöslich, unlöslich in Wasser.

Analyse: $C_{21}H_{30}O_7N_2$ (422,5)

ber.:	C	59,70	H	7,16	N 6,63
gef.:		59,36		7,10	6,88

N-((ß-Carbobenzoxyamino)-butyryl)-ß-aminoglutarsäure (IV).

Ansatz: 4,2 g III werden drei Stunden mit 15 cm^3 1 n NaOH auf der Maschine geschüttelt und vorsichtig mit konzentrierter Salzsäure unter guter Eiskühlung angesäuert.

Ausbeute: 3,0 g, entspr. 85% d.Th.
Die Verbindung ist farblos und konnte nur amorph erhalten werden. Sie schmilzt von 168-178° (unscharf). Gut löslich ist sie in Wasser, Eisessig, Methanol und Äthanol, unlöslich in Essigester, Benzol, Cyclohexan und Äther. Aus Lösungsmitteln fällt sie nur sehr schlecht wieder aus. Beim Versuch der Umkristallisation aus Wasser erhält man stets eine gallertige Masse.

E) L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S .

(1) F. KNOOP u. H. OESTERLIN, Z.physiol.Chem. 148,294 (1925).
F. KNOOP u. H. OESTERLIN, Z.physiol.Chem. 170, 186 (1927)

(2) H.v. EULER, E. ADLER, G. GÜNTHER u. N.B. DAS, Z.physiol. Chem. 254, 61 (1938),
H.A.KREBS u. P.P.COHEN, Biochem.J. 33, 1895 (1939).

(3) A.E.BRAUNSTEIN u. M.G.KRITZMANN, Enzymologia 2, 129 (1937).

(4) P.S.CAMMARATA u. P.P. COHEN, J.Biol.Chem. 187, 439 (1950).

(5) P.M.HERBST u. L.L.ENGEL, J.Biol.Chem. 107, 505 (1934)

(6) A.I.VIRTANEN u. T.LAINE, Nature 142, 165 (1938),
A.I.VIRTANEN u. T.LAINE, Biochem.J. 33, 412 (1939),
A.I.VIRTANEN, Ang.Chem. 65, 1 (1953),
A.I.VIRTANEN, Ang. Chem. 67, 381 (1955).

(7) A. PIUTTI, Gazz.chim.ital. 17, 521 (1887),
A. PIUTTI, Ber.dtsch.chem.Ges. 21, 351 (1888) Referate.
W. DIECKMANN, Ber.dtsch.chem.Ges. 38, 1654 (1905),
C. REDEMANN u. S. DUNN, J.Biol.Chem. 130, 341 (1939),
W. COCKER, J.Chem.Soc. (London) 1940, 1489,
Mc ILWAIN u. G M. RICHARDSON, Biochem.J. 33, 44 (1939),
R.H. BARRY, A.M. MATTOCKS u. W.H.HARTUNG, J.Amer.Chem.Soc 70, 693 (1948),
J.C. SHIVERS u. C R. HAUSER, J. Amer.Chem.Soc.69,1264 (1947),
C.R. HAUSER u. G.A. REYNOLDS, J.Amer.Chem.Soc.70,4250 (1948)
K.L. WATERS u.W.H. HARTUNG, J.Org.Chem. 10, 524 (1945).
K.E. HAMLIN u.W.H. HARTUNG, J.Biol.Chem. 145,349 (1942)

(8) F.KNOOP u. H.OESTERLIN, Z.physiol.Chem. 148,298 (1935)Fußnote
A.SKITA u. C.WULFF, Liebigs Ann.Chem. 453, 195 (1927),
J.GOOTJES u. W.Th. NAUTA, Rec.trav.Chim. 72, 721 (1953)

(9) W.WISLICENUS u. W. BECKH, Ber.dtsch.chem.Ges. 28, 790 (1895),
W.WISLICENUS u. W. BECKH, Liebigs Ann.Chem. 295,351 (1897)

(10) E.FISCHER u. E.KOENIGS, Ber.dtsch.chem.Ges. 37, 4601 (1904)

(11) R.LEUCKART, Ber.dtsch.chem.Ges. 18, 2341 (1885)

(12) A.N. KOST, A.P.TERENT'EV u. G.A.SHVERKHGEIMER, Izvest Akad Nauk.S.S.S.R., Otdel.Khim.Nauk 1951, 150-160 C.A. 45,10194 (1951)

(13) O. MUMM u. C. BERGELL, Ber.dtsch.chem.Ges. 45, 3044 (1912)

(14) L. CLAISEN, Ber.dtsch.chem.Ges. 24, 3900 (1891)

(15) E.E. van TAMELEN u. E.E. SMISSMAN, J.Amer.Chem.Soc. 74, 3713 (1952).
H.E.CARTER, W.R.HEARN, E.M.LANDSFORD jr., A.C. [illegible]
N.P. SALZMAN, D. SHAPIRO u. W.R.TAYLOR, J. Amer. Chem. Soc. 74, 3704 (1952)

(15) T.H. HASKELL, S.A. FUSARI, R.P. FROHARDT u. Q.R. BARK, J.Amer.Chem.Soc. 74, 599 (1952).

(16) L. BIRKHOFER u. I. STORCH, Ber.dtsch.chem.Ges. 86,32 (1953),
L. BIRKHOFER u. I. STORCH, Ber.dtsch.chem.Ges. 86,529 (1953)
L. BIRKHOFER u. I. STORCH, Ber.dtsch.chem.Ges.86,749 (1953)
L. BIRKHOFER u. I. HARTWIG,Ber.dtsch.chem.Ges.87,1189(1954)
L. BIRKHOFER u. I. STORCH, Ber.dtsch.chem.Ges.87,571 (1954).

(17) V.M. RODIONOV u. E. MALEWINSKAJA, Ber.dtsch.chem.Ges. 59, 2956 (1926)

(18) D.R.P. 496980 (I.G. Farben), Friedländer XVII, 815

(19) W.O. EMERY, Ber.dtsch.chem.Ges. 23, 3762 (1891)

(20) E. MYAMICHI, J.pharm.Soc.Japan 1926, Nr. 537, 95-96
Chem.Zbl. 1927.I, 1428
E. ABDERHALDEN u. F. REICH, Fermentforschung 10, 173 (1929)
E. ABDERHALDEN u. F. REICH, Fermentforschung 10, 319 (1929)
E. ABDERHALDEN, T. RYNDIN u. E. SCHWAB, Fermentforschung 11. 515 (1930).
E WALDSCHMIDT-LEITZ, A.SCHÄFFNER, H. SCHLATTER u. W.KLEIN. Ber.dtsch.chem.Ges.61, 299 (1028),
E. DYER u. E. BALLARD, J.Amer.Chem.Soc. 59, 1697 (1937),
E. DYER, J.Amer.Chem.Soc. 63, 265 (1941)

(21) Th. WIELAND, Ang.Chem. 63, 7 (1951),
Th. WIELAND, Ang.Chem. 66, 507 (1954).

(22) O. SÜS, Liebigs Ann.Chem. 572, 96 (1951),
St. GOLDSCHMIDT u. M.WICK, Liebigs Ann.Chem. 575, 217 (1952)
St. GOLDSCHMIDT u. H. LAUTENSCHLAGER, Liebigs Ann.Chem. 580, 68 (1953),
St. GOLDSCHMIDT u. H.L. KRAUSS, Ang. Chem. 67, 471 (1955).

(23) R. MOZINGO, Org.Synth. Coll.Vol. III, S. 181.

(24) H. ADKINS, "Practice of Organic Chemistry" New York 1940, S. 222

(25) E. VOGEL u. H.SCHINZ, Helv.chim.act. 33, 124 (1950).

(26) C.S. MARVEL u. E.E. DREYER, Org.Synth.Coll.Vol. I, S.233.

(27) P.S. PINKNEY, Org.Synth.Coll.Vol.II, S. 116.

(28) R. ADAMS, H.M. CHILES u. C.F.RASSWEILER, Org.Synth.Coll. Vol. I, S.9,
R. ADAMS u. H.M. CHILES, Org.Synth.Coll.Vol. I, S. 232.

Lebenslauf.

Ich wurde am 6. November 1927 als Sohn des Knappschaftsobersekretärs Gotthold Raabe und seiner Ehefrau Elise, geborene Stegemann, zu Dorsten (Westfalen) geboren.

Von 1934 bis 1938 besuchte ich die Volksschule und anschließend die Oberschule für Jungen in Gladbeck. 1943 wurde ich zum Luftwaffenhelferdienst und im Dezember 1944 zum Wehrdienst einberufen. Nach kurzer Kriegsgefangenschaft nahm ich ab Januar 1946 an einem Förderkursus zur Erlangung der Reife teil und bestand im Juni 1947 die Reifeprüfung.

Im Sommer-Semester 1948 nahm ich das Chemiestudium an der Universität Würzburg auf. Am 22. Mai 1951 legte ich die Diplom-Vorprüfung und am 26. Februar 1955 die Diplom-Hauptprüfung für Chemie ab. Seit dem 1. Dezember 1954 bin ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Chemischen Institut der Universität Würzburg angestellt. Ich habe mich noch bei keiner anderen Fakultät um die Erlangung des Doktorgrades beworben.